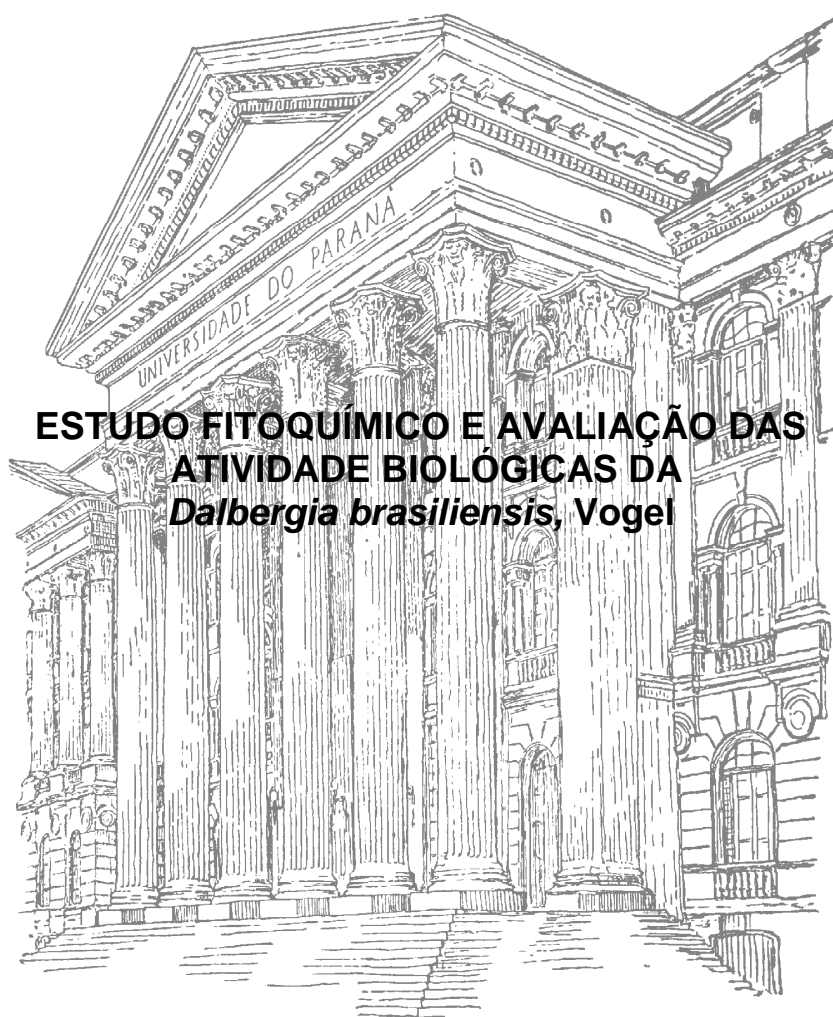


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE DALARMI



**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADE BIOLÓGICAS DA  
*Dalbergia brasiliensis*, Vogel**

CURITIBA  
2012

LUCIANE DALARMI

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA  
*Dalbergia brasiliensis*, Vogel**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Warumby  
Zanin

Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes  
Miguel

CURITIBA

Dalarmi, Luciane  
Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas da  
*Dalbergia brasiliensis*, Vogel / Luciane Dalarmi – Curitiba, 2012.  
109 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sandra Maria Warumbi Zanin  
Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Dalbergia brasiliensis*. 2. Atividade antioxidante.  
3. Isoflavonoides. 4. Esteroides. 5. *Aedes aegypti*. I. Zanin, Sandra  
Maria Warumbi Maria. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade  
Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

## TERMO DE APROVAÇÃO

**LUCIANE DALARMI**

**Título: ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA *Dalbergia brasiliensis*, VOGEL.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Profª. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin  
Orientadora

  
Profª. Dra. Marilis Dallarmi Miguel  
Universidade Federal do Paraná

  
Profª. Dra. Yanna Dantas Rattmann  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 12 de novembro de 2012.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, **Mara e Osvaldo** que permitiram que tudo isso fosse possível.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao meu marido **Ricardo** e minha filha **Luiza**, pelo companheirismo.

À **Profª Dra. Marilis Dallarmi Miguel** pelo constante incentivo, oportunidades e apoio.

À minha orientadora **Profª Dra. Sandra Warumby Zanin** pelo apoio, amizade e incentivo.

Ao Co-orientador **Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel** pela amizade, ensinamentos e pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao **Sr. Pedro Zanin** pelo conhecimento, amizade e por tanto contribuir para a realização do trabalho, principalmente no isolamento e identificação das substâncias.

À **Profª Dra. Ana Luísa Lacava Lordello** pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

A doutoranda **Cristiane Bezerra** pela amizade e apoio, e pelo experimento de *Aedes aegypti* que muito contribuiu ao meu trabalho.

As minhas amigas mestrandas: **Ana Flavia, Fernanda, Maria Fernanda, Daniella, Thais, Stella, Mariana** pela amizade e por terem dividido comigo suas experiências.

Aos amigos doutorandos: **Vinícius, Cristiane de Paula, Cristina Mayumi, Ranieri, Gislene, Milena e Beatriz** pelos ensinamentos dando a oportunidade de acompanhar em parte do desenvolvimento de seus trabalhos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a espécie *Dalbergia brasiliensis*, pertencente à família Fabaceae. Este estudo foi realizado a partir das folhas e cascas do caule desta espécie, coletadas na cidade de Curitiba, com os quais se preparou um extrato etanólico bruto que foi fracionado em porções de acordo com a polaridade dos constituintes. A partir das amostras obtidas, por meio de colunas cromatográficas, foram encontrados uma mistura de dois isoflavonóides na fração cloroformio da casca e uma mistura de cinco esteróides, na fração hexano da casca. Estes foram identificados por RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H, como afrormosina e fujikinetina, e os esteroides; colesterol, stigmasterol,  $\beta$  sitosterol, campesterol e stigmata 22 25 dien ol. O estudo de algumas atividades biológicas com as frações da espécie, revelaram grande capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio e pelo ensaio de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente nas frações clorofórmio e acetato de etila da casca e nas frações hexano e clorofórmio das folhas. Com relação ao teste de toxicidade sobre o microcústáceo *Artemia salina*, as amostras não apresentaram atividade no modelo testado. No ensaio com o *Aedes aegypti*, pode-se inferir que os extratos e frações de *D. brasiliensis* podem atuar como pesticidas no controle de vetores da dengue, destacando-se a fração clorofórmio da casca que obteve DL50 e DL90 inferior às demais.

**Palavras chave:** *Dalbergia brasiliensis*, atividade antioxidante, isoflavonoides, esteroides, *Aedes aegypti*.

## ABSTRAT

This research aimed to study the specie *Dalabergia brasiliensis*, belonging to the family Fabaceae. This study was conducted from the leaves and stem bark of this specie, collected in the city of Curitiba, which are prepared a crude ethanol extract that was fractionated into portions according to the polarity of the constituents. From the samples, by chromatography columns, were separed a mixture of two isoflavones in the chloroform fraction and a mixture of five steroids, in the hexane fraction from the stem bark. These were identified by RMN <sup>13</sup>C and RMN <sup>1</sup>H, as afrormosin and fujikinetin, and the steroids, cholesterol, stigmasterol,  $\beta$  sitosterol, campesterol and stigmata 22 25 dien ol. The study of some biological activities with the fractions of the specie, showed high antioxidant capacity of the specie through phosphomolybdenum complexometry method and the assay of thiobarbituric acid reactive specie (TBARS), mainly the ethyl acetate and chloroform fractions of the bark, and the hexane and chloroform fractions of leaves. Regarding the toxicity test through micro crustacean *Artemia salina*, the samples showed no activity in the model tested. In the trial with *Aedes aegypti*, concludes that the extracts and fravtions of *Dalbergia brasiliensis* can act as pesticides to control the dengue vector, highlighting the chloroform fraction of bark that got DL50 and DL90 inferior to the others samples.

**Keywords:** *Dalbergia brasiliensis*, antioxidant activity, isoflavones, steroids, *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ÁRVORE DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	26
FIGURA 2 -	FOLHAS DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	26
FIGURA 3 -	OCORRÊNCIA DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> NO BRASIL.....	28
FIGURA 4 -	ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.....	29
FIGURA 5 -	EXSICATA <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	40
FIGURA 6 -	APARELHO DE SOXHLET.....	51
FIGURA 7 -	<i>Artemia salina</i> .....	57
FIGURA 8 -	LARVAS DE <i>Artemia salina</i> NOS TUBOS COM AS FRAÇÕES TESTADAS.....	58
FIGURA 9 -	COMPOSTO ISOLADO 1.....	68
FIGURA 10 -	COMPOSTO ISOLADO 2.....	69
FIGURA 11 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTERÓIDES IDENTIFICADOS NO ISOLADO 1.....	69
FIGURA 12 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO DO RMN 13C DO COMPOSTO 1 (MISTURA DE ESTERÓIDES).....	70
FIGURA 13 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO DO RMN 13C DO COMPOSTO 1 (MISTURA DE ESTERÓIDES).....	74
FIGURA 14 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ISOFLAVONÓIDES AFRORMOSINA E FUJIKINETINA IDENTIFICADOS NO ISOLADO 2.....	75
FIGURA 15 -	ESPECTRO DE RMN13C DA MISTURA DOS ISOFLAVONOIDES.....	77
FIGURA 16 -	ESPECTRO DE RMN 13C DA AFRORMOSINA.....	77
FIGURA 17 -	ESPECTRO DE RMN13C DA FUJIKINETINA.....	78
FIGURA 18 -	DEPT DO COMPOSTO 1 (AFRORMOSINA E FUJIKINETINA).....	79
FIGURA 19 -	ESPECTRO DE RMN 1H DA MISTURA DOS ISOFLAVONÓIDES.....	79
FIGURA 20 -	ESPECTRO DE RMN 1H DA AFRORMOSINA.....	80
FIGURA 21 -	ESPECTRO DE RMN 1H DA FUJIKINETINA.....	80
FIGURA 22 -	REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO/ FOLHA.....	85
FIGURA 23 -	ANÁLISE DPPH DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DA FOLHA.....	91
FIGURA 24 -	RESULTADOS ATIVIDADE HEMOLÍTICA: [A] RESULTADO NEGATIVO, FRAÇÕES E EXTRATOS BRUTOS E [B] RESULTADO POSITIVO, PADRÃO SAPONINA.....	94
FIGURA 25 -	RESULTADO POSITIVO PARA HEMÓLISE NA FRAÇÃO HEXANO / CASCA.....	95
FIGURA 26 -	RESULTADO DILUIÇÃO EM SÉRIE DA FRAÇÃO HEXANO / CASCA...	95
FIGURA 27 -	RESULTADO NEGATIVO PARA HEMÓLISE IN VITRO.....	95
FIGURA 28 -	LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS PELOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	97



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS RELATIVAS À VITAMINA C.....	84
GRÁFICO 2 -	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS RELATIVAS À RUTINA.....	84
GRÁFICO 3 -	RESULTADOS TESTE TBARS.....	86
GRÁFICO 4 -	CURVA DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	87
GRÁFICO 5 -	CURVA DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 6 -	CURVA DO EXTRATO BRUTO DA FOLHA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 7 -	CURVA DA FRAÇÃO HEXANO DA FOLHA PELO REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 8 -	CURVA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO DA FOLHA PELA REDUÇÃO DPPH.....	89
GRÁFICO 9 -	CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA FOLHA PELA REDUÇÃO DPPH.....	89
GRÁFICO 10 -	CURVA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	89
GRÁFICO 11 -	CURVA DA FRAÇÃO HEXANO DA CASCA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	90
GRÁFICO 12 -	CURVA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO CASCA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	90
GRÁFICO 13 -	CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA CASCA PELA REDUÇÃO DPPH.....	90
GRÁFICO 14 -	IC50 DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	92

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	FITOCONSTITUINTES ISOLADOS DO GÊNERO DALBERGIA.....	21
TABELA 2 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICA DA D. <i>Glaucescens</i> .....	24
TABELA 3 -	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	25
TABELA 4 -	CRESCIMENTO DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> EM EXPERIMENTOS, NO PARANÁ E EM MINAS GERAIS.....	27
TABELA 5 -	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS A 20%.....	64
TABELA 6 -	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS A 20%.....	65
TABELA 7 -	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E CASCAS.....	66
TABELA 8 -	DETERMINAÇÕES REALIZADAS NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	67
TABELA 9 -	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	68
TABELA 10 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO DA MISTURA BSITOSTEROL, CAMPESTEROL E ESTIGMASTEROL.....	71
TABELA 11 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO DO COLESTEROL.....	72
TABELA 12 -	DESLOCAMENTO QUÍMICO DO STIGMATA 22 25 DIEN 3 OL.....	73
TABELA 13 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H DA AFRORMOSINA.....	76
TABELA 14 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup> C DA FUJIKINETINA...	81
TABELA 15 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>1</sup> H DA FUJIKINETINA....	82
TABELA 16 -	RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	83
TABELA 17 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO TESTE TBARS COMO ÍNDICE ANTIOXIDANTE (IA) EM PORCENTAGEM (%).....	86
TABELA 18 -	RESULTADO DE IC <sub>50</sub> E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH.....	91
TABELA 19 -	MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E DL <sub>50</sub> .....	93
TABELA 20 -	DL <sub>50</sub> , DL <sub>90</sub> E MORTALIDADE DE <i>A. aegypti</i> , SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>D. brasiliensis</i> .....	96
TABELA 21 -	EFEITO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>D. brasiliensis</i> NA MORTALIDADE DE <i>A. aegypti</i> .....	97
TABELA 22 -	MORTALIDADE ACUMULADA E CORRIGIDA DE LARVAS DE <i>A.</i> <i>aegypti</i> , SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE D. <i>brasiliensis</i> .....	98

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SOLUÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE HEMÓLISE <i>IN VITRO</i> .....	59
QUADRO 2 - DILUIÇÕES EM SÉRIE PARA AVALIAÇÃO DE HEMÓLISE.....	60

## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAR	- Atividade Antioxidante Relativa
ABAP	- Cloreto de 2,2-azo-bis-ácido
Abs	- Absorbância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	- Butil hidroxi tolueno
CaCl <sub>2</sub>	- Cloreto de cálcio
DAP	- Diâmetro na altura do peito da árvore
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DP	- Desvio padrão
DPPH	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2difênil-1-picrilhidrazina
EBC	- Extrato bruto da casca
EBF	- Extrato bruto da folha
ERMO	- Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio
FAEC ou AEC	- Fração acetato de etila da casca
FAEF ou AEF	- Fração acetato de etila da Folha
FCC ou CC	- Fração clorofórmio da casca
FCF ou CF	- Fração clorofórmio da folha
FHC ou HC	- Fração hexano da casca
FHF ou HF	- Fração hexano da folha
g/Kg	- Grama por kilograma
g/ml	- Grama por mililitro
IA	- Índice antioxidante
IC <sub>50</sub>	- Concentração inibitória média
mg/Kg	- Miligrama por kilograma
mg/ml	- Miligrama por mililitro
MIC	- Concentração inibitória mínima
ml/m <sup>2</sup>	- Mililitro por metro quadrado
nm	- Nanômetro
nº	- Número
°C	- Grau Celsius
ppm	- Parte por milhão
RMN 13C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN 1H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNS	- Espécies de nitrogênio reativas
ROS	- Espécies de Oxigênio Reativas
Rpm	- Rotação por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
T	- Temperatura
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARS	- Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
UR	- Umidade relativa
µg/ml	- Micrograma por mililitro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>04</b>
<b>ABSTRAT.....</b>	<b>05</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 FAMÍLIA FABACEAE.....	18
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Dalbergia</i> .....	19
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>Dalbergia brasiliensis</i> , Vogel	25
3.3.1 Enquadramento taxonômico da <i>Dalbergia brasiliensis</i> , Vogel.....	25
3.3.2 Descrição.....	25
3.3.3 Sinonímia vulgar.....	28
3.3.4 Ocorrência <i>Dalbergia brasiliensis</i> .....	28
3.4 FLAVONÓIDES.....	28
3.5 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO OXIGÊNIO.....	31
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	34
3.7 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	36
3.7.1 <i>Artemia salina</i> .....	37
3.7.2 Atividade Hemolítica.....	37
3.8 DENGUE.....	38
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	40
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	41
4.2.1 Determinação da umidade.....	41
4.2.2 Determinação das cinzas totais.....	41
4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	41
4.3.1 Extrato Etanólico 20%.....	42
4.3.1.1 Pesquisa de alcalóides.....	42
4.3.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas.....	43
4.3.1.3 Pesquisa de Heterosídeo Flavônico.....	43
4.3.1.3.1 Teste do Oxálico-Bórico /Reação de Taubock.....	44
4.3.1.3.2.Reação dePacheco.....	44
4.3.1.4 Pesquisa de Cumarinas.....	44
4.3.1.4 Pesquisa de Antraquinonas.....	46
4.3.1.5 Pesquisa de Iridoides.....	46
4.3.1.6 Pesquisa de Esteróides e/ou Triterpenos.....	46
4.3.1.6.1.Reação de Keller Kelliani.....	47
4.3.2 Extrato Aquoso 20%.....	47
4.3.2.1 Pesquisa de Antocianinas.....	47
4.3.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos.....	48
4.3.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos.....	48
4.3.2.4.Pesquisa de Taninos.....	49
4.3.2.5 Pesquisa de Amino Grupos.....	50
4.3.2.6 Pesquisa de Ácidos Fixos.....	50

4.3.2.7 Pesquisa de Ácidos Voláteis.....	50
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	51
4.4.1 Determinação do teor de sólidos.....	52
4.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	52
4.5.1 Isolamento do composto 1.....	52
4.5.2 Isolamento do composto 2.....	53
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
4.6.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio.....	53
4.6.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica através de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico.....	54
4.6.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH.....	55
4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	56
4.7.1 Preparo da Solução Salina.....	57
4.7.2 Eclosão de ovos.....	57
4.7.3 Preparo de Amostras.....	57
4.7.4 Avaliação da toxicidade.....	58
4.8 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA.....	59
4.8.1 Avaliação hemolítica in vitro.....	59
4.8.2 Avaliação hemolítica em Placas de Agar Sangue.....	60
4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA <i>Dalbergia brasiliensis</i> CONTRA O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	61
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	63
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	63
5.2.1 Determinação do teor de umidade.....	63
5.2.2 Determinação das cinzas totais.....	63
5.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	63
5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	67
5.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	67
5.6 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS.....	68
5.6.1 Isolamento do composto 1.....	68
5.6.2 Isolamento do composto 2.....	68
5.7 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	69
5.7.1 Identificação do composto 1.....	69
5.7.2 Identificação do composto 2.....	75
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	82
5.8.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio.....	83
5.8.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica através de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico.....	85
5.8.3 Redução do radical DPPH.....	87
5.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	92
5.10 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA.....	93
5.10.1 Avaliação hemolítica em Placas de Agar Sangue.....	93
5.10.2 Avaliação Hemolítica em tubos.....	94
5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA <i>D. brasiliensis</i> CONTRA O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	96
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios das civilizações, as plantas têm sido utilizadas pelo homem, como fonte de alimento e de tratamento de diversas doenças devido à sua abundância na natureza e facilidade de obtenção. O emprego das plantas no controle de diversas doenças e pragas talvez seja tão antigo quanto o próprio aparecimento da humanidade (FRANÇA, 2001).

Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas mais antigas civilizações, onde o homem primitivo, ao procurar plantas para o seu sustento, foi descobrindo espécimes com ação tóxica ou medicinal. Os benefícios obtidos com a utilização empírica levaram o homem a buscar sempre “novas” plantas, para o tratamento de diversas patologias. A experiência acumulada foi transmitida por inúmeras gerações, levando ao descobrimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna (SIMÕES *et al.*, 1986).

Além dos benefícios, observaram-se muitas reações tóxicas associadas às plantas, levando à necessidade de estudos criteriosos relativos à sua utilização. Diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos, principalmente nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO; BRITO, 1993).

Neste sentido, o estudo sistemático dos metabólitos secundários que ocorrem em determinada família ou gênero, conhecido como quimiotaxonomia, juntamente com as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais. Isto mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos e torna válidas as informações que foram sendo acumuladas durante séculos (NUNES JUNIOR, 1988).

Em nosso país, há uma grande diversidade de plantas com potencial terapêutico, o que estimula os pesquisadores no estudo de suas possíveis ações terapêuticas, bem como ações tóxicas, a fim de produzir medicamentos ou dermocosméticos com garantia de eficácia e segurança. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos

encontrados na natureza revelarem uma gama enorme de diversidade, em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996).

O reino vegetal tem sido considerado um reservatório potencial de fármacos e a partir do isolamento e da identificação estrutural das substâncias ativas vegetais, é possível recriá-los por síntese total em laboratório, ou utilizar a substância isolada como material de partida para a criação de estruturas químicas diferentes obtidas por procedimentos de modelagem molecular (HEEMANN, 2002).

Estudos fitoquímicos no gênero *Dalbergia*, família Fabaceae, mostram que se verifica a concentração de compostos químicos de grande interesse farmacológico, os flavonóides. Os flavonóides estão amplamente distribuídos em plantas como produto do metabolismo especial. Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas a estes metabólitos destaca-se a atividade antioxidante, devido à habilidade que os flavonóides têm de seqüestrar radicais livres e inibir a sua formação (PIETTA, 2000).

Vários trabalhos acadêmicos e artigos indicam que diversos tipos de danos teciduais, inclusive em tecidos vitais, são causados por grupos de substâncias químicas, os radicais livres, que são produzidas naturalmente em grandes quantidades no organismo. Dessa forma, já se conhece bastante sobre o papel dos radicais livres na produção de doenças, buscando-se agora tentativas de intervenção que possam minimizar os danos causados. Tais intervenções precisam assumir a forma de um ataque aos radicais livres, e este se dá pelo uso de substâncias com atividade antioxidante (YOUNGSON, 1996).

O gênero *Dalbergia* compreende árvores de pequeno a médio porte, arbustos e lianas, apresentando larga distribuição nas regiões tropicais da América Central e do Sul, muitas espécies são utilizadas na medicina tradicional chinesa (CLAUDINO, 2000). A química do gênero caracteriza-se pela produção de isoflavonóides, flavonóides, proantocianidinas, xantonóides, neoflavonóides, cinamoilfenóis, benzofenonas e rotenóides (VASUDEVA, 2010).

A espécie *Dalbergia brasilienses* ocorre de forma natural no Cerrado da Mata Atlântica do Brasil (CARVALHO, 2004). No levantamento bibliográfico realizado até o momento, não foram encontradas descrições fitoquímicas sobre a *Dalbergia brasiliensis*. Esta espécie, conhecida popularmente como Jacarandá, assim como as outras deste gênero, é muito utilizada em marcenaria, carpintaria e obras decorativas (CARVALHO, 2004).



O número de estudos com plantas medicinais tem crescido, no entanto, este crescimento é pequeno se comparado com a diversidade de espécies existentes na flora do país. Portanto, considerando as atividades biológicas encontradas em espécies do gênero *Dalbergia*, e a importância de estudos sobre os potenciais medicinais de plantas brasileiras ainda não estudadas quimicamente, justifica-se o estudo da *Dalbergia brasiliensis*, Voguel.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico aplicado da *Dalbergia brasiliensis*, avaliando suas atividades biológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico da espécie *Dalbergia brasiliensis*;
- Produzir os extratos e frações da *Dalbergia brasiliensis*;
- Realizar estudo preliminar do extrato bruto e frações da espécie;
- Isolar e identificar compostos;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações;
- Avaliar a atividade citotóxica por meio do bioensaio da *Artemia salina* do extrato bruto e frações;
- Avaliar a atividade hemolítica extrato bruto e frações;
- Avaliar a atividade larvicida da *Dalbergia brasiliensis* contra o mosquito *Aedes aegypti*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Realizou-se levantamento bibliográfico do gênero *Dalbergia*, da espécie *Dalbergia brasiliensis*, Vogel e seus sinônimos no Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Cab Abstracts, Medline, International Pharmaceuticals Abstracts, Lilacs, Sport Discus, PsycINFO e Life Sciences.

#### 3.1 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae (Leguminosae), dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, consiste de 440 gêneros e 12 mil espécies. O maior gênero, *Austragalus*, possui em torno de 2 mil espécies, sendo que vários gêneros possuem importante representatividade. A família Fabaceae encontra-se dispersa nas regiões temperadas, frias e também tropicais (CRONQUIST, 1981).

Joly (1998) afirma que a família das leguminosas compreende mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13 mil espécies (uma das maiores dentre as dicotiledôneas). A família das leguminosas encontra-se dispersa por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

As sementes freqüentemente contêm quantidades consideráveis de canavanina, um aminoácido não protéico aparentemente restrito a esta família. Cronquist (1981) sugere que a canavanina é um antimetabólito da arginina e tem um importante papel de defesa e estocagem de nitrogênio.

Seu valor econômico é significativo e junto com as gramíneas representam as mais importantes famílias produtoras de alimentos vegetais. A parte disto, a família Fabaceae produz valiosas drogas medicinais, espécies ornamentais, forrageiras, produtoras de azeites e inseticidas, fixadoras de nitrogênio e muitas outras funções (SALINAS, 1992).

São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anual ou perene e também muitas trepadeiras, vivem em diferentes altitudes e latitudes.

As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas ou estipelas às vezes transformadas em espinhos. As

folhas podem se apresentar modificadas em gavinhas ou estar reduzida a dois ou um só folíolo. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base, nos pecíolos ou nos peciólulos, que permitem movimentos diurnos (às vezes muito rápidos) às folhas em resposta a variados agentes (JOLY, 1998).

Flores variadas sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfas, diclamídeas com cálice gamossépalo, pentâmero ou tetrâmero; corola dialipétala pentâmera ou tetrâmera na maioria das vezes com pétalas muito desiguais. Androceu formado por quatro a dez estames, livres ou soldados entre si. Ovário sempre súpero, unicarpelar e unilocular, às vezes divididos por falsos septos, com muitos óvulos, fruto variado em geral legume, seco, deiscente por duas valvas, do tipo lomento segmentando-se, seco e indeiscente ou ainda de pericarpo mais ou menos carnoso. Sementes às vezes envoltas em mucilagens ou polpa doce, ou com arilo ou testa duríssima. Todas vivem simbioticamente com certas bactérias capazes de fixar o nitrogênio do ar, encontradas nos conhecidos nódulos ou raízes (JOLY, 1998).

Caules por vezes de estrutura anômala freqüentemente provido com vários tipos de pêlos. Apresentam comumente cristais solitários de oxalato de cálcio em algumas células da epiderme ou parênquima. Freqüente presença dispersa de células secretoras de tanino, gomas e outras substâncias como protoantocianinas, ácido cianogênico, mas não o ácido elágico e sem compostos iridóides, comumente produzem alcalóides especialmente dos grupos da piridina, quinolizidina e indol. As folhas contêm estômatos de diversos tipos (CRONQUIST, 1981).

### 3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Dalbergia*

Muitas espécies de *Dalbergia* são árvores de madeira importante, valorizadas pela sua madeira decorativa e, muitas vezes perfumadas, ricas em óleos aromáticos. Várias espécies são relatadas por serem usadas como afrodisíaca, expectorante, abortiva, antipirética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiarreica, para úlcera e sensação de queimação, curas de doenças de pele, doenças do sangue, reduz a obesidade, usado em leucoderma, repelente e larvicida. Em um estudo de revisão,

foi demonstrado uma compilação dos fitoconstituintes identificados no género conforme Tabela 1 (VASUDEVA et al., 2010).

A *Dalbergia sissoo* é uma árvore de folha caduca, perene e grande, encontrada na região de várzea em toda a Índia e em áreas indígenas do Paquistão, Bangladesh, Afeganistão e Nepal. É utilizada para o tratamento de uma variedade de doenças por diferentes grupos étnicos. O extrato aquoso de folhas de *Dalbergia sissoo* tem sido utilizado para o tratamento de gonorreia em países Árabes (FARAG et al., 2000). *Dalbergia sissoo* também tem sido utilizada na medicina popular como afrodisíaco, abortivo, expectorante, antipirético, anti-helmíntico e no tratamento de vários distúrbios digestivos e doenças de pele (ASIF; KUMAR, 2009).

Farag e colaboradores (2000) isolaram dois isoflavonoides glicosídeos na *Dalbergia sissoo*, 7-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 5)- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ Dglucopyranoside], e 7-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -Dglucopyranoside].

Estudos foram realizados com o óleo da *Dalbergia sissoo* para avaliar a atividade repelente e o desenvolvimento de larvas dos mosquitos *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. O óleo puro aplicado na superfície da água mostrou que a evolução das larvas é proporcional a dosagem. Ocorreu 100% da mortalidade das larvas do *Culex quinquefasciatus* (4 mL/m<sup>2</sup> em 24 horas), 90% do *Aedes aegypti* e 60% do *Anopheles stephensi*. O óleo, aplicado em partes do corpo de voluntários humanos exposta aos mosquitos, demonstrou também ação repelente. Os voluntários ficaram protegidos das mordidas dos mosquitos por 8 - 11 horas. A proteção (aproximadamente 91,6%) obtida pelo óleo da *Dalbergia sissoo*, foi comparada ao repelente comercial “Oléo Mylol” (aproximadamente 93,8% de proteção) segundo Ansari e colaboradores (1999).

TABELA 1 – FITOCONSTITUINTES ISOLADOS DO GÊNERO DALBERGIA

<b>Espécie</b>	<b>Isoflavonoides</b>
<i>D. odorifera</i>	3-Hidroxi Daidzeina, Koparina, Formononetina, Prunetina
<i>D. louvelli</i>	7,4 dihidroxi methoxi isoflavona
<i>D. paniculata</i>	Caviunina, Dalpalatina, Dalpateina, Dalpanol
<i>D. volubilis</i>	Biochanina A, Genisteina, Constanina, Odoratina, Gliceteina, Pseudobaptogenina, Fujikinetina, Cuneatina, Daidzeina
<i>D. olivera</i>	Olibergin A, Olibergin B
<i>D. spinosa</i>	Dalspinina, Dalspinosina
<i>D. retusa</i>	Retusina
<i>D. sissoo</i>	Tectorigenina
<b>Espécie</b>	<b>Isoflavona</b>
<i>D. odorifera</i>	Violinone, Vestitone, Sativone,
<b>Espécie</b>	<b>Flavona</b>
<i>D. odorifera</i>	Butina, Pinocembrina, Liquiritigenina, Isoliquiritigenina
<b>Espécie</b>	<b>Neoflavonoide</b>
<i>D. odorifera</i>	Melanettina, Stevenina, Dalbergina
<i>D. melanoxydon</i>	Melanoquina
<i>D. volubilis</i>	Seshadrina, Volubolina
<i>D. baroni</i>	Melanneina
<i>D. parviflora</i>	Latifolina, Cearoína
<b>Espécie</b>	<b>Glicosídeos</b>
<i>D. volubilis</i>	Volubilina, isovolubilina, Volubilinina
<i>D. lanceolaria</i>	Lanceolarina
<i>D. sissoo</i>	Sissotrina, Isocaviudina, Tectoridina, Cavinnina-7-glicosídeo
<i>D. paniculata</i>	Cavinnina-7-rhamnoglucosídeo, Paniculatina, Dalpaniculina
<b>Espécie</b>	<b>Quinonas</b>
<i>D. latifolia</i>	Dalbergione
<i>D. sissoo</i>	Dalbergenone
<i>D. retusa</i>	Obtustaquinol, Obtustaquinona
<b>Espécie</b>	<b>Terpenóides e esteróis</b>
<i>D. bupeana</i>	Kaiksaponina
<i>D. sissooids</i>	Ácido Oleanólico, sitosterol
<i>D. monetaria</i>	Friedelina, Estigmasterol, Campesterol, Sitosterol
<b>Espécie</b>	<b>Cinamil fenóis</b>
<i>D. cultrate</i>	Dalberatin A, Dalberatin B
<i>D. nigrescens</i>	Dalberatin C, Dalberatin D
<i>D. retusa</i>	4-cinamil-3-metoxicatecol, Obtustirene
<i>D. miscolobium</i>	Violastirene, Isoviolastirene
<b>Espécie</b>	<b>Quinonas</b>
<i>D. retusa</i>	Obtustaquinol, Obtustaquinone
<i>D. latifolia</i>	Dalbergione
<i>D. sissooids</i>	Sissoidenone
<i>D. sissoo</i>	Dalbergenone, Dalbergenone

Fonte: VASUDEVA, 2010

A atividade antiinflamatória das cascas de *Dalbergia sissoo* foi demonstrada por Asif e Kumar (2009). Esta atividade foi avaliada no extrato etanólico a 90% das cascas do caule pela indução de edema na pata traseira de ratos Wistar. Foi administrado 1% de carragenina e 0,5% de carboximetilcelulose como agente de suspensão pois não produz alterações evidentes em resposta da atividade. Após administração oral do extrato etanólico em diferentes doses (300, 500 e 100 mg/kg) a inibição do edema na pata traseira foi observado em intervalos de 30, 60 e 120 minutos. O efeito antiinflamatório foi comparado com uma dose padrão de indometacina (10 mg/kg). O efeito biológico aumentou com as doses crescentes. O extrato etanólico na concentração de 100 mg/kg se mostrou com atividade antiinflamatória maior que as outras doses durante todo o período de observação. No estudo de toxicidade aguda, o extrato etanólico de cascas de *Dalbergia sissoo* foi avaliado seguro nos ratos até 3000 mg/kg.

A atividade antiinflamatória do extrato etanólico 90% das folhas de *Dalbergia sissoo* foi estudado em diferentes modelos de inflamação em ratos. Utilizou-se a carragenina, a carragenina com caulim e a nistatina para indução de edema na pata posterior dos ratos. Após administração oral do extrato etanólico em diferentes doses (100, 300 e 1000 mg/kg) a inibição do edema na pata traseira foi observado em intervalos diferentes para cada substância indutora de edema. O extrato das folhas de *Dalbergia sissoo* inibiu o edema induzido pela carragenina, caulim e nistatina como também o granuloma gerado pela implantação de um pellet de algodão no abdome dos ratos. O extrato também inibiu a infiltração de corante em ensaio de permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos (HAJARE *et al.*, 2000).

Hajare e colaboradores (2000) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Dalbergia sissoo* não possui efeito ulcerogênico na mucosa gástrica de ratos em testes agudos e crônicos. Em estudos de toxicidade aguda, o extrato pode ser considerado seguro até 10,125 g/kg em ratos.

Várias isoflavonas (formononetina, castanin, odoratin, gliciteína, pseudobaptogenin, fujikinetin e cuneatin) foram isolados a partir da espécie *Dalbergia frutescens*. A partir destes compostos, foi avaliada a atividade antiprotozoário contra a *Giardia intestinalis*. A formononetina foi considerado o agente anti-giardial mais potente, com um valor de IC<sub>50</sub> de 30 mg / mL, em

comparação com o valor para metronidazol, a droga padrão de escolha, de 100 mg / mL (KHAN *et al.* , 2000).

A fração éter de petróleo, alcóolica e aquosa da *Dalbergia Lanceolaria* demonstraram atividade contra artrite induzida em ratos. Os efeitos dos extratos foram comparados com a cortisona, droga padrão para atividade anti-inflamatória e anti-artrite (SINGH; CHATURVEDI ,1966).

LIO e colaboradores (2005) determinaram nove flavonóides da *Dalbergia odorífera* por HPLC, nomeados de: 3-hydroxymelanettin, melanetin, stevenin, butein, isoliquiritigenin, dalbergin, 2,4dihydroxy-5-methoxybenzophenone, pinocembrin, 4methoxydalbergione.

Bernardino e colaboradores (2007) avaliaram a influência da saturação por bases e da relação Ca:Mg do substrato sobre o crescimento e qualidade de mudas de *Dalbergia nigra*. Não houve efeito significativo da elevação da saturação por bases sobre as características morfológicas e suas relações na produção de mudas de *D. nigra* quando a saturação foi igual ou superior a 14% no latossolo distrófico e 4% no latossolo álico. Para a produção de mudas, recomendou-se a utilização da calagem quando o substrato for o argissolo, com elevação da saturação por bases para próximo de 60% e corretivo com 100% de CaCO<sub>3</sub>.

O estudo fitoquímico dos extratos do caule da *Dalbergia glaucescens* em hexano e diclorometano foram realizados por Claudino e colaboradores (2009) através de técnicas cromatográficas usuais que conduziram ao isolamento e identificação de substâncias. Resultaram no isolamento de dois triterpenos, três esteróides, um pterocarpano, um neoflavonóide e um derivado do ácido cinâmico.

O extrato hexânico foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico frente a larvas de *Artemia salina*, obtendo assim uma DL50 de 503,18 ppm (foi considerado potencialmente bioativo extratos com DL50 =1000 ppm e substâncias puras DL50 =30 ppm). Os extratos brutos de *D. glaucescens* foram avaliados quanto as suas atividades: citotóxica, antioxidante (utilizando o radical livre DPPH) e antifúngica conforme Tabela 2. Os extratos foram testados frente a 8 cepas de fungos do gênero *Candida* (CLAUDINO *et al.* ,2009).



TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICA DA *D. Glaucescens*

Extratos	AC	AA	AF
Hexano	498,28	—	—
Diclorometano	35	25,07	inativo
Acetato de Etila	17,53	5,26	inativo
Metanol	20,2	46,26	ativo
Hidroalccolico	42,08	24,39	inativo

\*AA = Atividade antioxidante, EC50 (ppm)

\*AC = Atividade citotóxica, DL50 (mg/mL)

\*AF = Atividade antifúngica, diâmetro do poço: 5,00 mm; halo de inibição do controle: 36,00 mm.

Fonte: CLAUDINO, 2009

Kite e colaboradores (2010) identificaram um marcador químico na espécie *Dalbergia nigra* e determinou sua estrutura como um neoflavonoide (6-hydroxy-7-methoxy-4-(methoxyphenyl)-2H-1benzopyran-2-one (4'-O-methyl-melanetin) chamado de dalnigrin, por meio de técnicas espectroscópicas.

Okwute e colaboradores (2009) demonstraram o potencial da *Dalbergia saxatilis* na agricultura e na medicina por meio da atividade protetora, inseticida e antimicrobiana da espécie. As folhas secas em pó foram utilizadas como agente de controle da praga de feijão-caupi, *Callosobruchus maculatus*. Os danos foram drasticamente reduzidos quando as sementes do feijão foram tratadas com as folhas em pó da *Dalbergia saxatilis* na dose de 0,75g / 150 sementes. Ocorreu redução nos danos na colheita, oviposição e desenvolvimento larval, sem afetar a viabilidade das sementes. Da mesma forma, o extrato bruto etanólico 95% e a fração hexânica da casca da espécie mostraram atividade inseticida sobre mosquitos adultos. Os extratos brutos das folhas e cascas da *Dalbergia saxatilis* foram testados contra seis microrganismos patogênicos. O extrato das folhas foi ativo somente contra *Staphylococcus aureus* com concentração inibitória mínima (MIC) de 1000 µg/ml. O extrato da casca obteve atividade com MIC de 250, 125, 1000 µg/ml sobre *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

### 3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Dalbergia brasiliensis*, Vogel

#### 3.3.1 Enquadramento taxonômico da *Dalbergia brasiliensis*, Vogel

TABELA 3– ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA *Dalbergia brasiliensis*

<b>Segundo CRONQUIST, 1981</b>	
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonea)
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Gênero	<i>Dalbergia</i>
Espécie	<i>Dalbergia brasiliensis</i> , Vogel

#### 3.3.2 Descrição

A espécie *Dalbergia brasiliensis* é uma arvoreta à árvore caducifolia, conforme Figura 1, com 4 a 20 m de altura e 20 a 50 cm de DAP (CARVALHO, 2004). Seu tronco é cilindro, reto a levemente tortuoso e acanalado, nas árvores velhas. Fuste em média com 8m de altura, variando de 2,5 a 13 m de comprimento (IVANCHECHEN, 1988). Ramificação racemosa e dicotômica. Copa alta e ampla. Casca com até 11 mm. A casca externa é acastanhada, levemente áspera e rugosa, com fissuras verticais pouco profundas e com desprendimento em placas irregulares, com muitas lenticelas horizontais. A casca interna é de coloração amarelada, com textura fibrosa e estrutura laminada, com oxidação lenta. As folhas, ilustradas na Figura 2, são compostas, imparipenadas, ráquis com 12 a 15 cm de comprimento e 13 a 27 pares de folíolos linear. As flores são amarelas a creme, perfumadas, com 4 a 6 mm de comprimento, em inflorescência paniculadas, terminais e nas últimas axilas foliares. O fruto, sâmara monosperma, possui 3 a 5 cm de comprimento por 1,2 a 1,5 de largura. A semente é achatada, marron-amarelada, com 10 a 13 mm de comprimento por 4 a 7 mm largura (CARVALHO, 2004).



FIGURA 1- ÁRVORE DA *Dalbergia brasiliensis*  
Fonte: Autora, 2011



FIGURA 2- FOLHAS DA *Dalbergia brasiliensis*  
Fonte: Autora, 2011

A *Dalbergia brasiliensis* é uma planta hermafodita. Sua polinização acontece por meio de abelhas e outros insetos. O período de floração é de novembro a janeiro, no Estado de São Paulo e, de novembro a abril, no Paraná. Os frutos amadurecem de abril a agosto no Paraná e de abril a outubro em São Paulo (CARVALHO, 2004).

*Dalbergia brasiliensis* ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade, como cambissolo háplico alumínico, no sul do Paraná. Em plantios experimentais, tem crescido em solos de fertilidade química boa, com textura argilosa e com boa drenagem.

Esta espécie possui um crescimento lento a moderado, conforme demonstrado na Tabela 4, e está no grupo das espécies com silvicultura pouco conhecida no Paraná (CARVALHO, 1988). O crescimento inicial em altura e em diâmetro é moderado, com incremento anual médio de até 1,39 m e 1,6 cm, respectivamente, 6 anos após o plantio. Na cidade de Laranjeiras do Sul, Paraná, o Jacarandá apresentou alturas individuais variando de 0,2 a 2,04 m aos 12 meses (CARVALHO *et al.*, 1987).

A madeira do Jacarandá é moderadamente densa. O cerne possui cor amarelo-pálido à bege, mesmo em árvores velhas, ou com cerne irregularmente demarcado de cor marrom-rosado, com listras escuras (BURGER, 1979). Por apresentar belos efeitos decorativos, a madeira do Jacarandá é usada na fabricação de móveis finos e painéis decorativos. Também utilizada em carpintaria, marcenaria, tabuado, obras externas, esteios, vigas e cabos de ferramentas (CARVALHO, 2004).

TABELA 4– CRESCIMENTO DA *Dalbergia brasiliensis* EM EXPERIMENTOS, NO PARANÁ E EM MINAS GERAIS

Local	Idade (anos)	Espaçamento (m X m)	Plantas vivas (%)	Altura média (m)	DAP médio (m)
Adrianópolis, PR	2	4 X 2,5	60	2,36	-
Campo Mourão, PR	4	2 X 2	100	2,41	3
Campo Mourão, PR	8	4 X 2	83,3	9,29	13
Cianorte, PR	7	3 X 3	100	7,53	7,6
Colombo, PR	7	8 X 3	41	4,68	3,9
Dionísio, MG	6	3 X 2	86	4,2	4,8
Foz do Iguaçu, PR	4	4 X 3	80	5,08	5,2
Laranjeiras do Sul, PR	1	3 X 2	98	1,23	-
Laranjeiras do Sul, PR	6	3 X 3	46	5,97	7,6

Fonte: Carvalho, 2004

### 3.3.3 Sinonímia vulgar

A *Dalbergia brasiliensis* recebe outros nomes populares como, caroaba-brava (São Paulo), caviúna (Minas Gerais e São Paulo), caviúna-preta (Paraná e São Paulo), jacarandá, jacarandá graúdo, jacarandá rosa, jacarandá miúdo (Paraná), marmeleiro (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (CARVALHO, 2004).

### 3.3.4 Ocorrência *Dalbergia brasiliensis*

*Dalbergia brasiliensis* ocorre de forma natural no Brasil (Cerrado, Mata Atlântica), nos Estados (Figura 5): Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (LIMA, 2010).

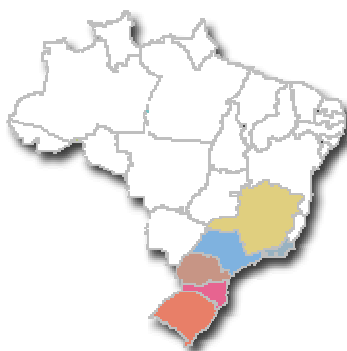


FIGURA 3– OCORRÊNCIA *Dalbergia brasiliensis* NO BRASIL  
Fonte: Lima, 2010

## 3.4 FLAVONÓIDES

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas, ao menos em parte, à sua capacidade de seqüestrar os radicais livres (DECKER, 1997).

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Eles representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. Estão presentes em abundância em angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (ZUANAZZI, 2000, p.489-493).

Estes compostos possuem baixo peso molecular e uma estrutura base de 15 carbonos, esqueleto defenilpropano, composta por dois anéis fenólicos (A e B) ligados por um anel pirano (C) conforme indicado na Figura 4 (BEHLING *et al*, 2004).

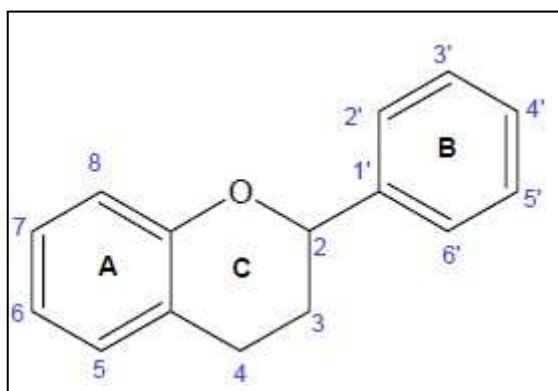


FIGURA 4- ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES

Fonte: ZUANAZZI, 2000

Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel pirano os flavonóides podem ser divididos em diversas classes: flavanois: hidroxila na posição 3 (como exemplo a catequina e epicatequina); flavonóis: carbonila na posição 4, hidroxila em 3 e uma ligação dupla entre 2 e 3 (como exemplo a quercetina e canferol); flavonas: carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre 2 e 3 (como exemplo a rutina e apigenina); antocianidinas: hidroxila na posição 3, ligação dupla entre o oxigênio e o carbono 2, e entre os carbonos 3 e 4 (como exemplo a cianidina); isoflavonoides: carbonila na posição 4 e o anel B está ligado ao restante da molécula pelo carbono 3 (como exemplo a genisteína); flavononas: carbonila na posição 4 (como exemplo a miricetina e naringenina).

Além dessas classes há as chalconas, auronas, diidrochalconas, flavandiol, bioflavonóides e protoantocianidinas.

Os flavonóides podem ocorrer como agliconas, porém freqüentemente ocorrem como glicosídeos, e dentro de uma mesma classe podem diferir entre si de acordo com o padrão de substituição do glicosídeo nos anéis A e B, que podem se ligar a molécula em C-3 ou C-7, sendo a primeira mais comum (SILVA, 2008).

São conhecidos mais de 4200 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. (ZUANAZZI, 2000).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas podemos citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos; inibição de enzimas (ZUANAZZI, 2000).

Flavonóides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos e isto é devido sobretudo a sua abundância relativa em quase todo reino vegetal; especificidade em algumas espécies; relativa facilidade de identificação; sua relativa estabilidade; seu acúmulo com menor influencia do meio ambiente (ZUANAZZI, 2000).

O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, como, por exemplo, as cores que esses pigmentos possuem, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá da Índia, na manufatura do cacau e suas contribuições em nutrição e sabor de alimentos. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, resultando de algumas propriedades importantes atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antivirais, antioxidantes e hipotensores entre outros (ZUANAZZI, 2000).

### 3.5 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO OXIGÊNIO

Radical livre é qualquer átomo ou molécula, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, um número ímpar de elétrons, em sua última camada eletrônica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999, NORDBERG; ARNER, 2001) . O elemento oxigênio (O), por definição, pode ser considerado um radical livre, uma vez que possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital, na última camada (HALLIWELL; GUTTERIDGE ,1999). Segundo Ferreira e Matsubara (1997) este desemparelhamento de elétrons da última camada, confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Espécies oxigênio reativas (ROS) ou espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) é um termo coletivo usado no meio científico, que inclui todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE ,1999; NORDBERG; ARNER, 2001). Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), outro termo popular utilizado para designar as ROS é oxidante. Entretanto, para esses autores o termo não é o mais adequado uma vez que algumas ROS (ex.  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$ ) podem atuar tanto como agentes oxidantes como redutores, em sistemas diferentes.

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2 \cdot$ ) e hidroxila ( $OH\cdot$ ) e, o não radical, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria e a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, NORDBERG; ARNER, 2001).

Radical superóxido ( $O_2^-$ ) é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG & ARNER, 2001). É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar



membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Radical hidroxila (OH) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos que qualquer outra ROS (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001). É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais ( $\text{Fe}^{++}$  ou  $\text{Cu}^{+}$ ), denominada reação de Fenton:



Segundo Ferreira e Matsubara (1997) se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimídicas, levando à mutação ou inativação do DNA. O radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) não é um radical livre, mas, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o OH; tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Uma vez produzido, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que possui baixa reatividade com a maioria das biomoléculas. Por outro lado, ele reage facilmente com outros radicais livres, gerando principalmente moléculas menos reativas. O óxido nítrico inibe a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Os danos ou injúrias celulares resultantes das ROS podem ser chamados estresse oxidativo. Em princípio este pode ser causado por redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular e pela produção elevada de ROS/RNS (espécies de nitrogênio reativas) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As ROS podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (peroxidação dos lipídeos). O alvo celular primário pode

variar, dependendo na célula, do tipo de estresse imposto e quanto severo é esse estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Os ácidos graxos polinsaturados são, devido a suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para o ataque de radicais livres, ou seja, uma peroxidação de lipídeos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A membrana que rodeia as células e organelas celulares possui alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados, por isso, ela é um dos componentes celulares mais atingidos pelas ROS em decorrência da peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação dos lipídios é uma reação em cadeia que passa pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação da peroxidação é causada pelo ataque a um lipídio de qualquer espécie de ROS que tenha reatividade suficiente para seqüestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno e o seu término ocorre quando os radicais lipídicos e peroxila produzidos, propagam-se até destruírem a si próprios. Ácidos graxos com uma ou nenhuma dupla ligação, são mais resistentes ao ataque que os ácidos graxos polinsaturados. O radical hidroxila é reconhecido como a espécie iniciadora da peroxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Nos sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxidos-redutores, como as ROS e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O<sub>2</sub>. Para proteger-se, do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante. Segundo Nordberg e Arnér (2001), o sistema antioxidante celular pode ser dividido em sistemas enzimáticos: superóxido dismutase, catalase, peroxiredoxinas, glutathione, glutathione redutase, glutathione peroxidase, e em sistemas não enzimáticos, como as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico. O sistema de defesa celular pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como destoxificadora do agente antes que ele cause lesão (glutathione reduzida, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E) e a outra como

reparadora da lesão ocorrida (ácido ascórbico, glutathione redutase e glutathione peroxidase). Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

### 3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SANCHÉZ-MORENO, 2002).

Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos (ALVES *et al.*, 2010).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES *et al.*, 2010).

Devido à larga divergência dos resultados de testes com antioxidantes naturais em alimentos, muitos protocolos e diretrizes têm sido estabelecidos no sentido de trazer ordem e concordância a este importante campo (FRANKEL; FINLEY, 2008). Para se ter uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como, onde e a extensão do dano causado. Assim, o entendimento sobre os efeitos dos compostos antioxidantes somente pode ser aperfeiçoado se metodologias mais específicas forem utilizadas, e se estas forem capazes de definir

quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes, e em quais condições, sistemas e alvos de proteção (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Halliwell (1995) propõe algumas questões que devem ser usadas para avaliar a ação antioxidante *in vivo*, que podem ser respondidas por experimentos simples e seu resultado nos permite rejeitar um possível antioxidante, pois um composto que exibe baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo*.

O efeito do sequestro de radicais é determinado não somente pela reatividade do antioxidante com o radical, mas também pela sua concentração. Embora muitos antioxidantes reajam rapidamente com o radical hidroxil, muitas moléculas biológicas, que são mais abundantes que os antioxidantes, reagem também rapidamente com esse radical. Por isso é praticamente impossível para algum antioxidante sequestrar o radical hidroxil efetivamente. Outro ponto importante é saber onde os radicais livres são produzidos, e se o antioxidante é capaz de alcançá-los. Por exemplo, a vitamina C é um potente sequestrador para radicais hidrofílicos, mas pobre frente a radicais lipofílicos (ALVEZ *et al.*, 2010).

Um dos fatores determinantes para atividade antioxidante de substâncias naturais é a sua solubilidade. Substâncias polares são mais efetivas em grandes quantidades de óleo porque podem se acumular na interface ar-óleo ou em micelas reversas dentro deste, onde as reações de oxidação lipídica ocorrem com maior frequência devido à alta concentração de oxigênio. Em contraste, antioxidantes não polares são mais efetivos em emulsões porque são retidos nas gotículas de óleo e/ou acumulados na interface óleo-água, onde ocorre a interação entre os hidroperóxidos das gotículas e substâncias pró-oxidante da fase aquosa como, por exemplo, os metais de transição (DECKER *et al.*, 2005).

Os testes antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado e o grau de inibição da oxidação é medido, e os ensaios utilizados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres (SANCHÉZ-MORENO, 2002; ALVEZ *et al.*, 2010).

### 3.7 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Ensaio de atividade biológica são de fundamental importância na triagem de estudo de um vegetal. Os ensaios toxicológicos complementam os ensaios biológicos (MACIEL; PINTO; VEIGA-JUNIOR, 2002) podendo ser abordado sob dois pontos de vista, o primeiro sob ponto de vista comercial onde a Portaria nº 116/1996 e a Resolução nº 90 de 16 de março de 2004 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 1996) que normatiza estudos de toxicidade crônica e aguda para produtos fitoterápicos e o segundo sob o desenvolvimento tecnológico tornando-se indispensável para validação de processos tecnológicos. (SONAGLIO *et al.*, 2007; BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (BAROSA *et al.*, 2003). Suas técnicas compreendem uma série de dados que podem ser obtidos por meio de microrganismos e animais de laboratório ou seres humanos, visando classificar a toxicidade de uma substância química. Portanto, pode-se elucidar que se trata de um bioensaio preliminar essencial no estudo de substâncias com atividade biológica a fim de avaliar suas possíveis interações com o organismo (CAVALCANTE *et al.*, 2000).

Métodos alternativos e testes *in vitro* estão sendo muito utilizados para avaliação da toxicidade pois podem diminuir o uso de animais na experimentação. Essas técnicas compreendem a utilização de organismos como: bactérias, fungos, algas e crustáceos além de frações subcelulares presentes no sistema biológico como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas. Estes ensaios podem servir como prévia de um estudo toxicológico *in vivo*, complementando e melhorando a sensibilidade e especificidade de estudos com animais (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

### 3.7.1 *Artemia salina*

Um dos métodos alternativos amplamente utilizados em triagem de substâncias de origem vegetal é o método que utiliza o microcrustáceo *Artemia salina*.

*Artemia Salina* é um microcrustáceo da ordem Anostraca utilizado na alimentação de peixes e camarões por seu alto valor nutritivo. Dependendo da alimentação ingerida esse microcrustáceo pode adquirir diversas colorações, sua característica é de nadar com a parte ventral do corpo voltada para cima, ou seja, para a luz, e de estarem sempre em locomoção, por serem animais filtradores e dependem disso para alimentar-se e respirar (ASEM, 2008).

A utilização da *A. salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado. A rapidez e o baixo custo favorecem a utilização em diversos estudos. Ensaio de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL<sub>50</sub>) (LUNA *et al.*, 2005; BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

Segundo MEYER, *et al.* (1982) foi estabelecido uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL<sub>50</sub>, de extratos de plantas sobre os microcrustáceos *Artemia Salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 µg/mL e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos. Diversos trabalhos vêm tentando correlacionar a toxicidade sobre *Artemia Salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasitocida.

### 3.7.2 Atividade Hemolítica

A hemólise é caracterizada por ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina. A hemoglobina livre no plasma é prejudicial a saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário a observação da referida atividade. Nesse sentido, na triagem de atividades biológicas

e toxicológicas de extratos vegetais, faz-se necessária a verificação da atividade hemolítica das espécies estudadas (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

Muitas são as metodologias disponíveis para a verificação da atividade hemolítica de espécies vegetais. A Organização Mundial de Saúde - OMS em seu manual de 1998 preconiza a avaliação qualitativa por observação de coloração vermelha decorrente da liberação de hemoglobina (OMS, 1998). Outra alternativa é o método de observação de formação de halos de hemólise em placas de Agar sangue (EFING, 2008). Uma técnica mais recente e recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA recomenda a observação de absorbância em ultra-violeta, sendo este um teste exigido no Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos (ANVISA, 2003). Independente da metodologia escolhida faz-se necessário a avaliação dessa atividade, indicando possíveis danos da espécie estudada sobre os eritrócitos.

### 3.8 DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa, de origem viral, transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) o principal vetor, como também da febre amarela (World Health Organization, 2008; COELHO *et. al.*, 2009). Está presente em muitos países, mais nos tropicais e sub-tropicais, tornando-se um problema de saúde internacional. No Brasil é considerada doença endêmica, tendo se tornado atualmente um problema de saúde pública (GARCEZ *et. al.*, 2009; Pan American Health Organization, 2008).

Nesta última década, o Brasil se tornou o país do mundo com o maior número de casos relatados de dengue, ocupando o primeiro lugar no ranking internacional do total de casos da doença, com mais de 3 milhões de casos relatados entre 2000 e 2005. Isto representou 78% de todos os casos notificados nas Américas e 61% de todos os casos relatados à Organização Mundial de Saúde (TEIXEIRA *et. al.*, 2009).

O controle vetorial, sistemas de vigilância e vacinas são fatores preventivos básicos da dengue. Na ausência de vacinas eficazes, o controle vetorial e a aplicação de inseticidas, que vem apresentando baixa eficácia e alto custo,

tornaram-se fatores importantes na eliminação de criadouros naturais e artificiais de mosquitos. Essas atividades de controle vetorial têm sido insuficientes para interromper o processo de transmissão (RIAZ, 2011; MACIEL, 2009; COELHO *et. al.* 2009).

Dentre os inseticidas utilizados estão o Temephós (larvicida organofosforado) granulado a 1% (Abate, Larvin, Larvel e outros), com  $LC_{50} = 8,7 \mu\text{g/ml}$  (OLIVEIRA *et. al.*, 2010), que possui baixa toxicidade; *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) que é um inseticida biológico e metoprene, substância análoga ao hormônio juvenil dos insetos, que atua nas formas imaturas (larvas e pupas), impedindo o desenvolvimento dos mosquitos para a fase adulta. Tanto o temephós quanto o BTI e o metoprene, são agentes de controle de mosquitos, aprovados pela Organização Mundial da Saúde para uso em água de consumo humano, por suas características de inocuidade para o homem e mamíferos em geral (FUNASA, 2001).



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados folhas e caule da *Dalbergia brasiliensis*, cidade de Curitiba, no estado do Paraná, Brasil. A identificação desta espécie botânica, foi realizada pelo botânico e curador Osmar dos Santos Ribas, do Museu Botânico Municipal da prefeitura de Curitiba-PR e foi comparado com a exsicata de numeração 189342 conforme fotografia demonstrada na Figura 5.



FIGURA 5 - EXSICATA *Dalbergia brasiliensis*  
Fonte: Autora, 2011

O material botânico após a separação foi moído, submetido à determinação de água e cinzas totais e armazenado ao abrigo da luz e umidade.

## 4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 4.2.1 Determinação da umidade

Utilizou-se o método gravimétrico da Farmacopéia Brasileira (2010) para determinação de umidade.

Pesou-se um grama do material em triplicata, em cadinho de porcelana previamente seco. O material pesado foi secado em estufa a 100-105°C durante 3 horas e após resfriado em dessecador, e novamente pesado. O processo de secagem foi repetido até peso constante não diferindo por mais de 5 mg entre as duas últimas pesagens.

### 4.2.2 Determinação das cinzas totais

Para determinação de cinzas totais foi realizado o método descrito pela Farmacopéia Brasileira (2010). Este processo tem como objetivo estabelecer a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração.

Previamente o cadinho de porcelana foi calcinado em mufla a 450°C por 30 minutos e resfriado em dessecador. Pesou-se no cadinho tarado 1g do material vegetal. Incinerou-se em mufla 450°C por duas horas e em seguida o cadinho com o material calcinado foi colocado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação ao material seco.

## 4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

Visando a identificação dos principais grupos químicos presentes nas folhas e nas cascas do caule da *Dalbergia brasiliensis*, procedeu-se inicialmente o ensaio sistemático de análise fitoquímica utilizando metodologias descritas por MOREIRA (1979, p. 13-39), MATOS e MATOS (1988, p. 223-230) e MIGUEL (2003) com adaptações.

#### 4.3.1 Extrato Etanólico 20%

Preparou-se o extrato etanólico 20% pelo processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora, utilizando 40 g de material vegetal e 200 mL de etanol 70% (líquido extrator). Decorrida uma hora, retirou-se o frasco do banho maria, filtrou-se o extrato e o volume completado até 200 mL com o líquido extrator.

Concentrou-se o extrato etanólico 20% até adquirir 1/3 de seu volume com o intuito de eliminar o excesso de etanol. Realizou-se o fracionamento com hexano, diclorometano e acetato de etila, solventes em ordem crescente de polaridade, com auxílio de um funil de separação. Para cada fração foram utilizados 20 mL do extrato e o volume completado para 200 mL com o próprio solvente. O resíduo do extrato constituiu a fração hidroalcoólica remanescente, tendo seu volume completado para 200 mL com etanol.

Estas frações foram utilizadas para pesquisa de alcalóides, leucoantocianidinas, flavonóides, cumarinas, antraquinonas, esteróides e triterpenos.

##### 4.3.1.1 Pesquisa de alcalóides

Os alcalóides são compostos de caráter básico e sua solubilidade em diferentes reagentes, modifica em função do pH. Os alcalóides na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes aquosos; na forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos.

Esta pesquisa fundamenta-se na capacidade que os alcalóides possuem, em estado de sal, de combinar-se com iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio e formarem precipitados.

Para realização deste ensaio 50 mL de cada fração obtida pelo processo descrito anteriormente foram secos em banho-maria a 70°C. Dissolveu-se o resíduo em 1 mL de etanol e acrescentou-se 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se para tubos de ensaio 1 mL de cada extrato clorídrico e procedeu-se a pesquisa para alcalóides com 2 gotas dos seguintes reativos: reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio) observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca; reativo de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) observando formação de precipitado de coloração tijolo; reativo de Bouchardat observando formação de precipitado de coloração alaranjado e reativo de Bertrand

(ácido sílico túngstico) observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Em caso de reação positiva, transferir o restante do extrato clorídrico para um funil de separação, alcalinizar com hidróxido de amônia até pH 9 ou 10 e extrair com uma solução de clorofórmio e éter (3:1), sendo três extrações de 15 ml. Reunir os extratos de éter clorofórmio e levar à secura em banho Maria. Ao resíduo adicionar 0,5 ml de etanol e 5 ml de ácido clorídrico (HCl) 1%. Aquecer ligeiramente, esfriar e dividir em 5 tubos de ensaio. Pesquisar os alcalóides com os reativos gerais para alcalóides.

#### 4.3.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonóides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Esta pesquisa explica-se com a reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina (de coloração vermelha) em presença de ácido clorídrico.

Pesquisou-se leucoantocianidinas nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, submetendo-se 10 mL das respectivas frações a secura em banho-maria (70 °C) e recuperação com 5 mL de etanol, 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e aquecimento até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.

#### 4.3.1.3 Pesquisa de Heterosídeo Flavônico

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonóide em presença de ácido. Levou-se à secura em banho-maria (70° C) 10 mL das frações hexano, diclorometano e acetato de etila, adicionou-se 5 mL de etanol e transferiu as para tubos de ensaio. A fração hidroalcoólica não foi levada à secura, apenas transferida diretamente (5 mL) para um tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio (pó), ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta pesquisa deve ser realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de béquer com gelo, dentro da capela). Reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavona com coloração amarelo a vermelho; flavonol e dihidroflavonol

com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelho a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelho tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

#### 4.3.1.3.1 Teste do Oxálico-Bórico ou Reação de Taubock

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou-se e levou-se novamente à secura. Ao resíduo adicionou-se 5 mL de éter etílico e transferiu-se os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência. Esta reação é explicada pela formação de quelatos, produzindo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados do ácido borínico (compostos obtidos do ácido bórico com substituições na molécula por dois radicais orgânicos). A reação oxalo-bórica determina aparecimento de fluorescência amarela esverdeada para flavonóis; flavanonas e isoflavonas não apresentam fluorescência e os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

#### 4.3.1.3.2 Reação de Pacheco

Transferiu-se para cápsula de porcelana, 10 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidralcoolico, levar à secura em banho-maria, aquecer o resíduo em um fogareiro adicionado cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético e 0,1 mL de HCl concentrado. O desenvolvimento de coloração roxa é positiva.

#### 4.3.1.4 Pesquisa de Cumarinas

Esta pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxí cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e consequente formação do ácido hidroxí cinâmico ou sais de seu ânion. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida em soluções recém preparadas ou soluções estocadas no escuro por meses; no

entanto, ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos. Comparações efetuadas entre a forma *cis* e *trans* do ânion cumarínico demonstraram que apenas na forma *trans* o hidrogênio do grupo fenólico está localizado para possibilitar sua quelação (anel de seis membros), visto que, a insaturação não é bloqueada pelo grupo carboxila, havendo possibilidade da ligação quelato relacionar-se com a fluorescência. O foto efeito também aparece em soluções alcalinas dos derivados cumarínicos que não possuem hidroxila livre ligada ao grupo benzênico, havendo relação entre os substituintes e o grau de fluorescência. Derivados cumarínicos com grupos hidroxilas livres ligados ao anel benzênico apresentam fluorescência azul intensa no estado sólido e em soluções alcalinas (em soluções alcalinas não ocorre foto efeito, havendo dificuldade para estabelecer um teste específico para hidroxicumarinas, visto que a observação de qualquer fluorescência produzida por irradiação é de difícil visualização, já que estes compostos possuem fluorescência própria).

A fração hidroalcoólica em pH 1 (acidificada com HCl 2N) foi reduzida de 30 mL a 5 mL (em banho-maria), resfriada e com auxílio de funil de separação, extraída com éter etílico (2 vezes de 10 mL). As frações adquiridas com as duas extrações foram reunidas e concentradas em banho-maria (50°C) até 5 mL. As frações hexano, diclorometano e acetato de etila, foram levados ao banho Maria 50°C (30 mL) até secura e recuperadas em 5 mL de éter etílico. Para tubos de ensaio, transferiu-se 3 mL de cada extrato etéreo, adicionou-se 2 mL de hidróxido de sódio 1N, levou-se os tubos à câmara de luz ultravioleta em 365nm e deixados em exposição por 15 minutos. Para reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

Depositou-se a sobra dos extratos etéreos em papel de filtro em três pontos previamente marcados com grafite, concentrando-os de modo a obter manchas com aproximadamente 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com uma gota de hidróxido de sódio 1N. Cobriu-se com uma moeda a mancha 1 e levou-se o papel de filtro à câmara de ultravioleta a 365 nm, deixando-o em exposição por 15 minutos.

Ocorrendo reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

#### 4.3.1.4 Pesquisa de Antraquinonas

Transferiu-se para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade, 30 mL da fração de acetato de etila e 5 mL de solução aquosa a 10% de ácido sulfúrico. Acoplou-se o balão a um condensador de bolas e levou-o a refluxo por 30 minutos. Decorrido os trinta minutos, retirou-se o balão e filtrou-se o extrato sulfúrico ainda quente.

Adicionou-se ao filtrado 30 mL de água destilada e concentrou-se o extrato até 5 mL e transferiu-se a tubo de ensaio e efetuou-se a reação de Borntraeger ao adicionar 5 mL de hidróxido de amônio e agitar lentamente.

Para reação positiva observa-se o aparecimento de coloração vermelha devido ionização das hidroxilas fenólicas.

#### 4.3.1.5 Pesquisa de Iridoides

Transferir para cada tubo de ensaio 2 ml das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica e adicionar pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 ml de HCl R. O aparecimento de coloração verde escura indica a presença de substâncias iridoidais.

Transferir para cada tubo de ensaio 2 ml das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica e adicionar duas gotas de ácido sulfúrico R. O aparecimento de coloração rosa violáceo indica a presença de substâncias iridoidais.

Transferir para cada tubo de ensaio 2 ml das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica e adicionar cristais de vanilina e duas gotas de ácido sulfúrico R. O aparecimento de coloração rosa cereja indica a presença de substâncias iridoidais.

#### 4.3.1.6 Pesquisa de Esteróides e/ou Triterpenos

Evaporou-se à secura 30 mL de cada fração, recuperou-se com 5 mL de clorofórmio e filtrou-se. Pipetou-se 1 mL de cada extrato clorofórmico para tubos de ensaio e completou-se o volume para 2 mL com clorofórmio.

Efetua-se a reação de Liberman-Bouchard adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente.

A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito.

Coloração verde indica função hidroxila na posição três e duplo enlace em cinco e seis ou sete e oito. Coloração amarela, possível presença de metila no carbono número cartorze.

#### 4.3.1.6.1 Reação de Keller Kelliani

Separar 4 tubos de ensaio e transferir 2 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila, e hidroalcoolica, levar à secura. Dissolver o resíduo com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. Transferir a mistura cautelosamente para um tubo de ensaio que contenha 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Desenvolvimento de coloração na zona de contato dos líquidos, coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos e a coloração azul ou verde na fase acética, indica reação para desoxiaçúcares (azul esteróides, verde triterpeno).

#### 4.3.2 Extrato Aquoso 20%

Preparou-se o extrato aquoso 20% pelo processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora, utilizando 40 g de material vegetal e 200 mL de água destilada (líquido extrator). Decorrida uma hora, retirou-se o frasco do banho-maria, filtrou-se o extrato e o volume completado até 200 mL com o líquido extrator, lavando o material. Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

##### 4.3.2.1 Pesquisa de Antocianinas

A antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas, com colorações que modificam de acordo com o pH. Com ácidos, as antocianinas



reagem formando sais de oxônio corados de vermelho e com bases reagem com hidroxilas fenólicas livres e adquire coloração azul devido a estrutura quinóide.

Para realização deste ensaio, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidificou-se o primeiro tubo com HCl 1% (pH aproximadamente 4), alcalinizou-se o segundo tubo com hidróxido de amônio (pH aproximadamente 10) e neutralizou-se o terceiro tubo (pH 7). O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violácea em meio neutro, indica reação positiva.

#### 4.3.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

Agitou-se energicamente com movimentos succionais por cinco minutos os tubos da pesquisa de antocianinas, deixando-os em repouso por trinta minutos. Mediu-se a altura do anel de espuma, formado logo após agitação e decorrido trinta minutos. Reação positiva é indicada com desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso.

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com consequente formação de espuma mediante agitação (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997, p.62).

#### 4.3.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas ( $\beta$ -glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997, p. 64).

Para este ensaio utilizou-se a reação do isopurpurato de sódio, que ocorre na transferência para um tubo de ensaio de 5 mL de extrato aquoso (cuidando-se para não umedecer as paredes do tubo de ensaio), adição de 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N, suspensão de uma tira de papel picro-sódico no tubo e encaminhamento ao banho-maria por trinta minutos à 60 °C.

Reação positiva é observada com a formação de isopurpurato de sódio que apresenta coloração castanha a avermelhada.

O papel picro-sódico é preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1 cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

#### 4.3.2.4 Pesquisa de Taninos

Os taninos são divididos em duas classes considerando os núcleos fenólicos existentes e na união destes. Os taninos hidrolisáveis apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose. Estes ésteres são facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcar (ROBBERS *et al.*, 1997).

Os taninos condensados contêm núcleos fenólicos que muitas vezes estão ligados a carboidratos ou a proteínas. A maioria dos taninos condensados, são resultantes da condensação de dois flavan-3-óis, ou mais (catequina) ou de flavan-3,4-dióis (leucocianidina) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Para a pesquisa de taninos os seguintes reagentes foram utilizados:

- Cloreto Férrico: adicionou-se três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1 mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração verde indica flavonóides e coloração marrom indica polifenóis.
- Formol Clorídrico: também conhecido como ensaio de Staniasny. Transferiram-se 30 mL de extrato aquoso para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade e adicionou-se 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Acoplou-se o balão a um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante uma hora. Decorrido o tempo, deixou-se esfriar e filtrou-se o extrato formol-clorídrico reservando o filtrado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Lavou-se o resíduo da filtração com uma solução de etanol 50%, gotejando sobre o resíduo da lavagem gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Reação positiva para taninos condensados visualiza-se com desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio.

Utilizando-se o filtrado reservado adicionou-se excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Reação positiva

para taninos hidrolisáveis visualiza-se com desenvolvimento de coloração azul ao adicionar o cloreto férrico.

#### 4.3.2.5 Pesquisa de Amino Grupos

Com auxílio de um condensador de bolas e temperatura de 60 °C, concentrou-se 10 mL de extrato aquoso até 5 mL. Em tira de papel de filtro, adicionaram-se cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, nebulizou-se o papel de filtro com solução de ninhidrina levando-o à estufa (95-100 °C) durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

#### 4.3.2.6 Pesquisa de Ácidos Fixos

Transferiram-se 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N para balão de fundo chato com 100 mL de capacidade, acoplou-se um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante trinta minutos. Decorrido o tempo, esfriou-se e acidificou-se o extrato alcalino com solução de ácido sulfúrico 1N. Procedeu-se extração, com auxílio de um funil de separação, com 10 mL de éter etílico (três vezes).

Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50 °C. Aqueceu-se o resíduo em estufa à 100 °C por dez minutos, esfriou-se, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1N e filtrou-se. Adicionaram-se três gotas do filtrado anterior a um papel de filtro, obtendo-se uma mancha com aproximadamente um centímetro de diâmetro e pingou-se sobre esta mancha uma gota de reagente de Nessler. Para controle negativo utilizou-se uma mancha com o reativo de Nessler. Levou-se o papel de filtro à estufa por cinco minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom.

#### 4.3.2.7 Pesquisa de Ácidos Voláteis

Com solução de ácido sulfúrico 1N, acidificou-se 10 mL de extrato aquoso. Colocou-se o extrato ácido em tubo de ensaio e levando à fervura, determinou-se o

pH dos vapores com auxílio de fita indicadora de pH presa ao tubo com rolha de cortiça.

O aparecimento de pH abaixo de sete indica presença de ácidos voláteis.

#### 4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

O extrato bruto foi obtido a partir do material vegetal em etanol, com a utilização do aparelho de Soxhlet conforme ilustrado na Figura 6. Os extratos obtidos foram previamente filtrados com algodão e submetidos à concentração em evaporador rotatório com pressão reduzida à temperatura de 50 °C e 90 rpm. Em seguida os extratos foram armazenados em frascos âmbar e filtrados a vácuo em funil de Büchner. Após filtração a vácuo, os extratos retornaram aos frascos âmbar e foram armazenados na geladeira. Após o preparo dos extratos, fez-se determinação do teor de sólidos. O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, cloroformio e acetato de etila. O etanol utilizado para o preparo dos extratos foi recuperado e reservado para ser utilizado nos ensaios que o exigiram.



FIGURA 6- APARELHO DE SOXHLET  
Fonte: Autora, 2011

#### 4.4.1 Determinação do teor de sólidos

Utilizando-se técnica adaptada de MIGUEL (2003), depositou-se 1 mL de extrato bruto etanólico a ser analisado em cadinho pesado, levou-se a estufa 100 °C até peso constante e procedeu-se aos cálculos onde o resultado é apresentado em quantidade de sólidos em 1 mL e porcentagem em peso do teor de sólidos em relação ao material vegetal.

#### 4.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

As frações obtidas do extrato foram passadas em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200 mm, e fase móvel hexano/acetato de etila, clorofórmio/acetato de etila e acetato de etila/metanol. A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secar em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

As amostras foram recolhidas em frascos de vidro de aproximadamente 10 ml e foram levadas a secar em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Nos frascos com precipitados, as amostras foram resuspendidas e filtradas para se obter os cristais. Realizou-se cromatografia em camada delgada para verificação da pureza. Esses cristais foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

Foram isolados e identificados dois compostos da casca da *Dalbergia brasiliensis* nomeados de compostos 1 e 2. Os demais cristais foram encaminhados para purificação e posterior identificação.

##### 4.5.1 Isolamento do composto 1

O primeiro composto isolado foi da fração hexano da casca da *Dalbergia brasiliensis*. Em uma coluna de vidro, preparou-se a sílica-gel a ser depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha. O sistema eluente iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 100% de acetato de etila. A partir deste utilizou-se metanol como gradiente, com variação de 5%. Foram coletadas porções de

aproximadamente 10ml em frascos de vidro. As alíquotas foram reunidas por similaridade de composição visualizada em cromatografia de camada delgada (fase móvel 93:7, tolueno e acetato de etila). Após a evaporação do solvente constatou-se a presença de cristais nos frascos 21 ao 25.

#### 4.5.2 Isolamento do composto 2

O segundo composto foi isolado da fração clorofórmio da casca da *Dalbergia brasiliensis*. O sistema eluente iniciou com 100% de hexano, tendo clorofórmio como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 100% de clorofórmio. A partir deste foi utilizado o sistema eluente clorofórmio/acetato de etila com variação de 5%, até a proporção de 70:30, seguindo com a variação de 10% até 100% de acetato de etila. Na sequência, utilizou-se o metanol como gradiente de polaridade na variação de 5% até a proporção de 70:30, seguindo com a variação de 10% até 100% de metanol. Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 10ml em frascos de vidro. Nos frascos com precipitados, as amostras foram reunidas (frasco 23 ao 26) por similaridade de composição visualizada em cromatografia de camada delgada (fase móvel 93:7, tolueno e acetato de etila). As amostras foram resuspendidas e filtradas para se obter os cristais.

### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 4.6.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Esse ensaio baseia-se na técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguiar (1999). Possui capacidade de avaliar componentes lipofílicos e hidrofílicos.

A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como a amostra das frações testada, estavam na

concentração de 200 µg/mL solubilizado de acordo com sua solubilidade (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, foi retirado uma alíquota de 0,1 mL da amostra, e adicionado 1 mL de reativo. O mesmo foi feito para os padrões. O branco foi constituído de 0,1 mL de metanol e 1 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Posteriormente, manteve-se a série de tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro de UV da marca shimadzu, modelo UV 1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme a equações:

AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C:

$$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (Vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

AAR% EM RELAÇÃO À RUTINA:

$$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (Rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), avaliando as diferenças entre as concentrações e amostras pelo teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.6.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica através de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico

As mesmas amostras obtidas da casca do caule e das folhas de *Dalbergia brasiliensis* foram submetidas ao teste TBARS (espécies reativas do ácido

tiobarbitúrico), segundo metodologia adaptada de MORAIS *et al* (2006), utilizando a concentração de 1000 ppm (partes por milhão). O BHT (butil hidróxi tolueno) foi empregado como padrão. Todo o procedimento foi realizado em quintuplicata.

Em tubos de ensaio foram adicionados 1000 ppm de amostra, 400 µL de água destilada, 500 µL da solução de gema de ovo a 5% em dodecil sulfato de sódio, como fonte de lipídeos. Em seguida, foram adicionados a cada um dos tubos de ensaio 50 µL de solução de cloreto de 2,2-azo-bis-ácido (ABAP) a 0,035 %, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico - TBA (0,4% p/v) em solução de dodecil sulfato de sódio - SDS (0,55% p/v).

O material assim preparado foi submetido ao banho-maria (95 °C) por 1 hora, sob agitação. Após resfriamento, foram adicionados a cada tubo 1,5 mL de n-butanol, centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes mensurados em espectrofotômetro em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com tubos controle, nos quais foram adicionados todos os reagentes exceto as amostras, e também no tubo branco, o qual o ABAP foi substituído por água. A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem, segundo a equação:

$$IA (\%) = 1 - (Abs \text{ amostra} / Abs \text{ controle}) \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), avaliando as diferenças entre as concentrações e amostras pelo teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.6.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais.



O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado espectrofotometricamente segundo Mensor e colaboradores (2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas das frações nas concentrações de 15 a 125 µg/mL, das quais 2,5 mL foram adicionados a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para as frações hexano foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 450 µg/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 100 - \left\{ \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \right\} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), avaliando as diferenças entre as concentrações e as amostras pelo teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

A realização de bioensaios para determinações de citotoxicidade como ensaio complementar a estudos fitoquímicos é muito importante, dentre os mais utilizados, é a toxicidade frente *Artemia salina*, ilustrada na Figura 7. Este biosensaio é eficiente, apresenta facilidade no manuseio e rapidez dos ensaios. A pequena quantidade de amostra e o baixo custo deste ensaio, favorece a utilização na rotina do laboratório e na seleção e monitoramento das pesquisas de plantas na procura de substâncias ativas (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Procedeu-se o preparo do ensaio conforme metodologia citada por Meyer *et al.* (1982).



FIGURA 7- *Artemia salina*  
Fonte: Autora, 2012

#### 4.7.1 Preparo da Solução Salina

A água do mar artificial foi preparada com 38 g de sal marinho (23 g NaCl, 11 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1,3 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,7 g KCl ) e 1000 mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan e colaboradores (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

#### 4.7.2 Eclosão dos Ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados na água salgada para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30 °C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente.

#### 4.7.3 Preparo das Amostras

O estudo foi realizado com as frações obtidas da *Dalbergia brasiliensis*. As amostras foram levadas à secar em banho-maria (40°C), pesadas aproximadamente 20 mg e adicionados solvente em quantidade suficiente para obter

a concentração inicial da solução de 10 mg/mL. Como solventes foi utilizado o metanol.

Desta solução 2,5; 25 e 250  $\mu$ L foram transferidos com pipeta automática para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000  $\mu$ g/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (KALEGARI, 2009).

#### 4.7.4 Avaliação da Toxicidade

Após a eclosão dos ovos, 30 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para cada tubo de ensaio contendo as frações, conforme Figura 8, e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, os quais foram evaporados juntamente com as amostras. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL.

Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL50 e 95% de intervalos de confiança (FINNEY, 1971). As frações foram consideradas ativas quando DL50 foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

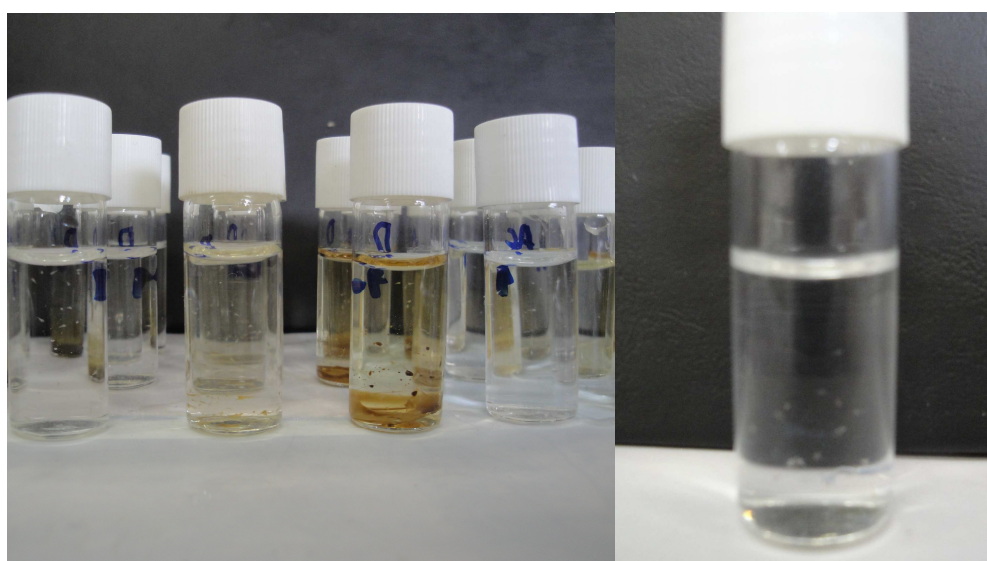


FIGURA 8- LARVAS DE *A. salina* NOS TUBOS COM AS FRAÇÕES TESTADAS  
Fonte: Autora, 2012

## 4.8 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA

### 4.8.1 Avaliação Hemolítica *in vitro*

Para o preparo da solução foi transferido 1 mL de sangue de carneiro (Marca Newprov) para o balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com tampão fosfato pH 7,4 (suspensão diluída 2%).

A solução somente pode ser usada enquanto o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor e deve ser mantida fria.

Para a realização do teste foi necessário preparar a diluição em série do extrato vegetal com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue a 2%. Foram usados 4 tubos de ensaio, partindo do extrato de *Dalbergia brasiliensis* na concentração de 1000 µg/mL, conforme o quadro 1.

Após o preparo da solução foi necessário agitar cuidadosamente os tubos de ensaio evitando a formação de espuma e aguardar 30 minutos. Agitar novamente e deixar em repouso por 150 minutos e centrifugar novamente por 5 minutos, a 3000 rpm. Após este processo foi preciso examinar os tubos de ensaio e anotar em qual dos tubos ocorreu hemólise total, ou seja, onde ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos.

QUADRO 1 - SOLUÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE HEMÓLISE IN VITRO

Tubos de Ensaio	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo
Extrato vegetal (ml)	0,1	0,2	0,5	1
Tampão fosfato pH 7,4 (ml)	0,9	0,8	0,5	-
Suspensão de sangue 2% (ml)	1	1	1	1

Nas amostras que ocorreram hemólise, após este processo foi preparada a diluição em série em 13 tubos de ensaio com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue à 2%, conforme o Quadro 2.

Após o processo descrito no Quadro 2, os resultados foram observados após 24 horas e foi verificada a concentração que produziu hemólise total. A referência para controle positivo do teste foi a saponina. Usou-se solução salina recém preparada.

QUADRO 2 - DILUIÇÕES EM SÉRIE PARA AVALIAÇÃO DE HEMÓLISE

Tubos	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo	5º tubo	6º tubo	7º tubo	8º tubo	9º tubo	10º tubo	11º tubo	12º tubo	13º tubo
Extrato ou diluição (mL)	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	1
Tampão fosfato	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	-
Suspensão de sangue 2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

#### 4.8.2 Avaliação Hemolítica em Placas de Ágar Sangue

Esta análise avalia a capacidade da substância estudada em realizar o rompimento das hemácias liberando hemoglobina no plasma.

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado segundo a metodologia difusão em Ágar sangue na concentração de 1000 µg/mL, em duplicata. Como controle positivo foi utilizado padrão de saponina na mesma concentração e para controle negativo foi utilizado uma solução salina de 0,9%.

Para o ensaio de difusão em ágar utilizou-se a técnica de antibiograma em discos, papéis Whatmann nº1 (7 mm de diâmetro, esterilizado) foram distribuídos sobre as placas de ágar sangue e em seguida impregnados com alíquotas de 20 µL das frações anteriormente preparadas. Como controle foi utilizado 20 µL dos respectivos solventes puros, aplicados aos discos. Após a aplicação, os meios foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm). A presença de saponinas pode gerar ação hemolítica (EFING, 2008).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA *Dalbergia brasiliensis* CONTRA MOSQUITO *Aedes aegypti*

A atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* de extratos e frações obtidos da espécie *Dalbergia brasiliensis* foi realizada segundo metodologia do World Health Organization (1981) com algumas modificações. Os testes foram conduzidos com extrato bruto etanólico e frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de folhas e cascas da espécie.

Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - RJ; sendo utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para a espécie *Aedes aegypti* (HARTBERG e CRAIG, 1970). Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 ml de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $80 \pm 5\%$ .

A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval.

Foram preparadas soluções de concentração de 1.000 µg/ml dos extratos e frações, solubilizando as amostras com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro em concentrações distintas de 1.000, 500, 250 e 125 µg/ml para os testes.

Foram colocadas 15 larvas do 3º estágio em copo de plástico contendo as amostras e o volume foi completado para 5 ml. Para cada concentração foram usadas 45 larvas em triplicata. Solução aquosa de DMSO 0,5 % foi utilizada em triplicata como controle negativo.

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981). Os valores da concentração letal ( $DL^{50}$  E  $DL^{90}$ ) em µg/ml foram determinados utilizando o método de análise Probit (FINNEY, 1974). As médias de mortalidade obtidas foram submetidas ao teste de Tukey a 5,0%.

Para determinação dos valores relativos à mortalidade acumulada e corrigida, calculada de acordo com a Equação 1 sugerida por Abbott (1925).

$$\% \text{ de mortalidade corrigida} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de vivos do controle} - \text{n}^{\circ} \text{ de vivos tratados} \times 100}{\text{Número de vivos do controle}}$$

Os resultados obtidos foram analisados levando-se em conta os diferentes extratos testados e a porcentagem de mortalidade das larvas obtidas nos diferentes tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação das médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram obtidos manualmente 4200 gramas de folhas e 3100 gramas de cascas de caule fragmentados de *Dalbergia brasiliensis*. O material botânico foi seco em temperatura ambiente por 10 dias.

### 5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 5.2.1 Determinação do teor de umidade

A média do teor de umidade encontrada na amostra da folha foi de 6,32% e da casca foi de 6,89%. O teor de umidade é importante para o conhecimento básico, podendo ser utilizado como parâmetro para o controle de qualidade de amostras, possibilitando a segurança para análises posteriores, na preparação de extratos, rendimento e identificação dos constituintes.

#### 5.2.2 Determinação das cinzas totais

O conteúdo de cinzas totais estabelece a qualidade de substância residual não volátil no processo de incineração (CÍRIO *et al.*, 2003). Os dados obtidos na análise de cinzas totais contribuem significativamente no controle de qualidade. As análises foram realizadas em triplicata, a média encontrada na folha foi 4,88% e na casca foi de 4,783%.

### 5.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

As análises qualitativas fitoquímicas da *Dalbergia brasiliensis* foram realizados a partir dos extratos hidroalcólico, demonstrado nas Tabelas 5 e 6, e aquoso das cascas do caule e folhas a 20%, na Tabela 7.



TABELA 5 - ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS A 20%

Análise		Extrato hidroalcoólico	Fração hexano	Fração Acetato de etila	Fração Diclorometano
Alcalóides	Reativo Mayer	+	–	–	–
	Reativo Dragendorff	+	–	–	–
	Reativo Bouchardat	+	–	–	–
	Reativo Bertrand	–	–	–	–
Flavonóides	Leucoantocianidinas	–	–	–	–
	Heterosídeos Flavônicos	+	–	+	–
	Oxálico bórico	–	–	–	–
	Pacheco	–	–	–	–
	Zinco em HCl	–	–	–	–
Cumarina		–	–	–	–
Antraquinonas		–	–	–	–
Esteróides/ Triterpenos	Liberman-Bouchard	+	+	+	+
	Keller-Kelliani	+	–	–	–
Iridoides	Acido	–	–	–	–
	Acido e Vanilina	–	–	–	–
	Floroglucinol	–	–	–	+

Nota: + = positivo  
 - = negativo

Ao pesquisar alcalóides nas cascas e folhas da *Dalbergia brasiliensis*, verificou-se reação negativa para o reativo de Bertrand e reação positiva para os reativos de Mayer, Dragendorff e Bouchardat com aparecimento de turvação em ambas as amostras caracterizando substância de alta densidade eletrônica como açúcar e taninos como observado na tabela 7.

Na pesquisa de flavonóides nos extratos da casca, a cor visualizada foi a cor laranja na fração acetato de etila, indicativo de flavonas; e cor vermelho a vermelho sangue na fração hidroalcoólica indicativo de flavonol e dihidroflavonol. Nos extratos das folhas ocorreu resultado positivo para flavonol na fração acetato de etila, com

coloração vermelho a vermelho sangue e, na fração hidroalcoólica, com coloração laranja, indicando flavona.

TABELA 6 - ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS A 20%

Análise		Extrato hidroalcoólico	Fração hexano	Fração Acetato de etila	Fração Diclorometano
Alcalóides	Reativo Mayer	+	—	—	—
	Reativo Dragendorff	+	—	—	—
	Reativo Bouchardat	+	—	—	—
	Reativo Bertrand	—	—	—	—
Flavonóides	Leucoantocianidinas	—	—	—	—
	Heterosídeos Flavônicos	+	—	+	—
	Oxálico bórico	+	—	+	—
	Pacheco	—	—	—	—
	Zinco em HCl	—	—	—	—
Cumarina		—	—	—	—
Antraquinonas		—	—	—	—
Esteróides/ Triterpenos	Liberman-Bouchard	+	+	+	+
	Keller-Kelliani	—	+	—	—
Iridoides	Acido	—	—	—	—
	Acido e Vanilina	—	—	—	—
	Floroglucinol	—	+	—	—

O teste do Oxálico-Bórico confirmou a presença de flavonol e flavona nas frações hidroalcoólicas das cascas e folhas apresentando fluorescência amarela. As frações acetato de etila apresentaram leve fluorescência.

Na pesquisa de iridóides, a utilização do floroglucinol, resultou cor verde para a fração hexano das folhas, salientando que esta fração possui cor verde em outra tonalidade. Nas frações das cascas, a fração diclorometano apresentou cor lilás.

Na pesquisa de esteróides e/ou triterpenos, as colorações visualizadas nos extratos das cascas foram: amarelo na fração hexano e hidroalcóolica, rosáceo

escuro na fração diclorometano e acetato de etila. No extrato das folhas ocorreu cor verde na fração hexano, rosáceo escuro na fração diclorometano e acetato de etila e amarelo na fração hidroalcóolica. A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito. Coloração verde indica função hidroxila na posição três e duplo enlace em cinco e seis ou sete e oito. Coloração amarela, possível presença de metila no carbono número cartorze. O teste Keller-Kelliani confirmou o verde na fração hidroalcoolica das cascas e na fração hexano das folhas.

Na pesquisa de antocianidinas no extrato aquoso das cascas (Tabela 7), houve desenvolvimento de cor avermelhada em meio ácido indicando reação positiva.

As saponinas estão presentes nas cascas, pois o anel de espuma formado, no tubo ácido das antocianidinas, foi maior que um centímetro após agitação e permaneceu após trinta minutos.

Na pesquisa de taninos, utilizando-se solução aquosa de cloreto férrico 1%, visualizou-se coloração verde nas folhas, indicativa de flavonóides e cor marron nas cascas, indicativa de polifenóis. No Ensaio de Staniasny, houve desenvolvimento de coloração verde no extrato das cascas indicando reação positiva para taninos condensados.

A pesquisa de amino grupos apresentou resultado positivo com presença de coloração azul violácea.

TABELA 7- ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E CASCAS

Análise	Extrato Aquoso de cascas	Extrato Aquoso de folhas
Heterosídeos Antocianicos	+ meio ácido	—
Heterosídeos Saponínicos	+ meio ácido	—
Heterosídeos Cianogênicos	—	—
Ácidos Voláteis	—	—
Taninos	Hidrolisáveis	—
	Condensados	+
Ácidos Fixos	—	—
Aminogrupos	+	+

#### 5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto foi obtido a partir das folhas e das cascas do caule de *Dalbergia brasiliensis*. O rendimento do extrato e o teor de sólidos apresentam-se expressos na Tabela 8.

Os extratos brutos obtidos, das folhas e cascas, foram utilizados para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, cloroformio e acetato de etila.

TABELA 8- DETERMINAÇÕES REALIZADAS NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS *Dalbergia brasiliensis*

Parâmetro	<i>Dalbergia brasiliensis</i>	
	Folhas	Cascas
Quantidade inicial de material vegetal utilizada	4070g	2800g
Volume após concentração	1100mL	650mL
Rendimento do extrato bruto	12,16%	13,02%
Teor de sólidos do extrato bruto	0,45g/ml	0,56g/ml

#### 5.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

A extração com solventes orgânicos em extrator de Soxhlet é considerado um processo eficiente e bastante utilizado. Com a utilização do Soxhlet, utiliza-se um volume pequeno de solvente, que fica sob aquecimento e a todo o momento em contato com a amostra promovendo uma maior interação entre estas (PAIVA *et al.*, 2004).

Iniciou-se a extração com 406,62 g do extrato bruto de folhas e 338,55 g do extrato bruto das cascas. Foram obtidas as frações acetato de etila, clorofórmica e hexânica. As frações foram evaporadas em banho-maria em temperatura 70 °C. Os rendimentos estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA *Dalbergia brasiliensis*

Material vegetal	Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa seca
Folha	Hexano	82,02	20,17
	Cloroformio	25,94	6,38
	Acetato de Etila	38,88	9,56
Casca	Hexano	11,21	3,31
	Cloroformio	25,28	7,46
	Acetato de Etila	10,68	3,15

## 5.6 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Foram isolados e identificados dois compostos da casca da *Dalbergia brasiliensis* nomeados de compostos 1 e 2. Os demais cristais foram encaminhados para purificação e posterior identificação.

### 5.6.1 Isolamento do composto 1

Após realização da coluna cromatográfica, o primeiro composto isolado foi da fração hexano da casca da *Dalbergia brasiliensis*. O rendimento do cristal (figura 9) foi de 36,7 mg.



FIGURA 9 – COMPOSTO ISOLADO 1  
Fonte: Autora, 2012

### 5.6.2 Isolamento do composto 2

O segundo composto foi isolado da fração clorofórmio da casca da *Dalbergia brasiliensis* onde constatou-se a presença de 33 mg de cristal (figura 10).



FIGURA 10 – COMPOSTO ISOLADO 2  
Fonte: Autora, 2012

## 5.7 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

### 5.7.1 Identificação do composto 1

Através dos resultados obtidos no RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  do isolado 1, da fração hexano da casca de *Dalbergia brasiliensis*, e pela comparação com dados da literatura, pode-se concluir que este composto representa uma mistura de cinco esteróides: colesterol,  $\beta$  sitosterol, estigmasterol, campesterol e stigmata 22 25 dien 3 ol, os quais têm suas estruturas químicas ilustradas na figura 11 .

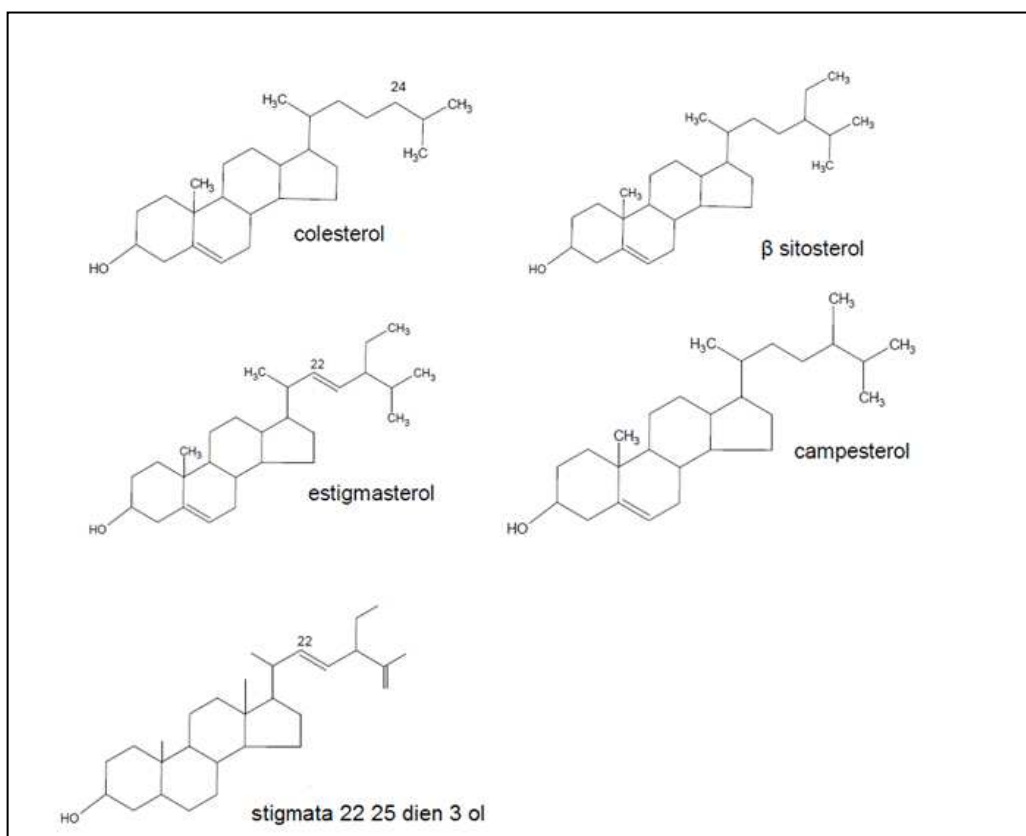


FIGURA 11– ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEROIDES IDENTIFICADOS NO ISOLADO 1

Os fitoestereóides, por apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes, normalmente estão presentes em uma mistura de difícil separação. Os mais comuns são  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol (PINTO *et al.*, 1993). Nas tabelas 10, 11 e 12 estão apresentados os deslocamentos químicos da mistura de esteróides composta no isolado 1, o qual possuem valores muito próximos da literatura, tornando possível a identificação. Para esta caracterização realizou-se experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , conforme figuras 12 e 13.

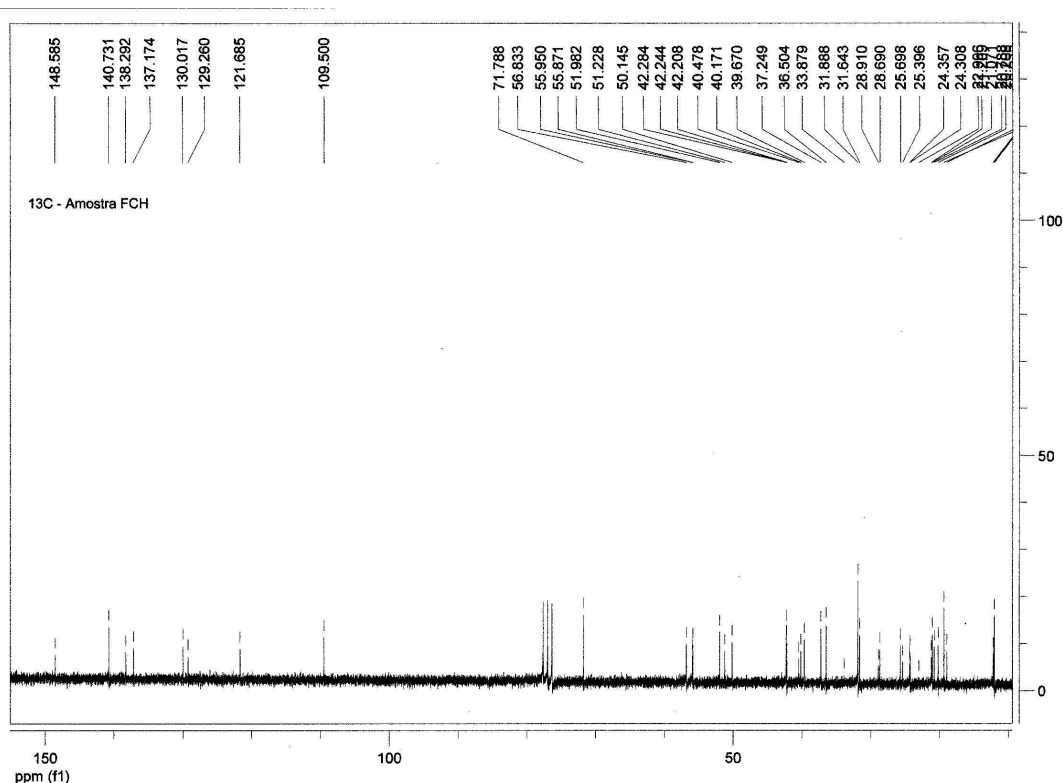


FIGURA 12- DESLOCAMENTO QUÍMICO DO RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO 1 (MISTURA DE ESTEROIDES)

Tabela 10- DESLOCAMENTO QUÍMICO DA MISTURA B-SITOSTEROL, CAMPESTEROL E ESTIGMASTEROL

Posição	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H	
	Experimental CHCl <sub>3</sub> 50MHz	ABDELNUR (2006) CHCl <sub>3</sub> 200MHz	Experimental CHCl <sub>3</sub>	ABDELNUR (2006) CHCl <sub>3</sub>
1	37,25	37,2	-	-
2	33,87	33,9	-	-
3	71,79	71,9	3,51 m	3,51m
4	38,67	39,7	-	-
5	140,73	140,3	-	-
6	121,68	122,1	5,34 d J=5,14	5,34 d J=5,04
7	31,88	31,9	-	-
8	31,64	31,8	-	-
9	50,15	50,1	-	-
10	36,58	36,4	-	-
11	21,21	21,2	-	-
12	40,48	40,4	-	-
13	42,28	42,3	-	-
14	56,83	56,7	-	-
15	24,31	24,2	-	-
16	28,69	28,2	-	-
17	55,95	56	-	-
18	12,05	11,9	-	-
19	19,39	19,3	-	-
20	36,5	36,7	-	-
21	18,97	18,7	-	-
22	138,29	138,2	5,2 dd J= 7,5 e 15,6	5,11 dd J=8,0 e 15,7
23	129,26	129,3	5,05 dd J= 8,1 e 15,1	5,03 dd J= 8,0 e 15,3
24	28,91	29,1	-	-
25	31,88	31,8	-	-
26	20,21	19,8	-	-
27	18,97	19	-	-
28	22,95	23	-	-
29	12,05	12,2	-	-



TABELA 11- DESLOCAMENTO QUÍMICO DO COLESTEROL

Posição	<sup>13</sup> C			<sup>1</sup> H			
	Experimental CHCl <sub>3</sub> 200MHz	KASAL (2010) CHCl <sub>3</sub> 150,9MHz	POPJBK (1977) CHCl <sub>3</sub> 20MHz	Experimental CHCl <sub>3</sub> 50MHz	MARTINEZ CHCl <sub>3</sub> 400MHz	ZIPSER (1998) Metanol 500MHz	KASAL (2010) CHCl <sub>3</sub> 600MHz
1	37,25	37,2	37,6	-	-	-	-
2	31,64	31,57	32	1,5	-	1,5	-
3	71,79	71,78	72,1	3,55	3,5	3,39	3,53
4	42,21	42,2	42,6	2,28	-	2,13	-
5	140,73	140,69	141,1	-	-	-	-
6	121,68	121,7	122	5,33 d J=5,14	5,35	5,34	5,35
7	31,88	31,87	32,2	1,95	-	1,95	-
8	31,64	31,85	32,2	1,46	-	1,5	1,46
9	50,15	50,06	50,5	0,86	-	-	0,93
10	37,25	36,46	36,8	1 s	1	-	-
11	21,21	21,04	21,4	-	-	-	-
12	40,17	39,73	40,1	-	-	-	-
13	42,24	42,27	42,6	0,8	0,8	-	-
14	56,83	56,71	57,1	1 s	-	-	0,99
15	24,31	24,26	24,6	-	-	-	-
16	28,69	28,21	28,5	-	-	-	-
17	55,95	56,09	56,5	-	-	-	-
18	12,05	11,83	12	0,68 s	-	0,72	0,68
19	19,39	19,37	19,6	1,02	-	1,02	1,01
20	36,5	35,76	36,1	1,37 m	-	-	1,37
21	18,97	18,68	18,9	0,91 m	-	0,94	0,91
22	37,25	36,15	36,5	1,37 m	-	-	1,33
23	24,31	23,79	24,2	1,34 m	-	-	1,34
24	39,67	39,48	39,8	1,12 m	-	-	1,12
25	28,91	27,99	28,3	1,52 d J= 2,06 0,85-0,86 d	-	-	1,52
26	24,31	22,54	22,7	J=10,9	-	0,87	0,87
27	24,31	22,81	22,9	0,85-0,86 d J=10,9	-	-	0,87

TABELA 12- DESLOCAMENTO QUÍMICO DO STIGMATA 22 25 DIEN 3 OL

Posição	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H	
	Experimental CHCl <sub>3</sub> 200MHz	AKIHISA (1990) CHCl <sub>3</sub> 50MHz	Experimental CHCl <sub>3</sub> 400MHz	AKIHISA (1990) CHCl <sub>3</sub> 200MHz
1	36,5	36,75	-	-
2	28,69	27,47	-	-
3	71,79	73,78	4,7	4,69
4	33,89	34,02	-	-
5	44,27	44,65	-	-
6	28,69	28,59	-	-
7	31,88	31,97	-	-
8	35,5	35,47	-	-
9	55,87	54,23	-	-
10	35,03	35,47	-	-
11	21,21	21,17	-	-
12	39,67	39,86	-	-
13	42,28	42,52	-	-
14	56,83	56,49	-	-
15	24,31	24,23	-	-
16	28,91	28,73	-	-
17	55,95	55,97	-	-
18	12,13	12,14	-	-
19	12,24	12,26	-	-
20	40,17	40,23	-	-
21	20,79	20,76	-	-
22	137,17	137,26	5,23 dd J=7,8 e 15,1	5,2 dd J= 7,9 e 15,6
			5,16 dd J= 7,3 e 15,1	5,05 dd J= 8,13 e 15,14
23	130,02	129,98	2,47 J=7,1	2,42 J= 7,1
24	51,98	51,99	-	-
25	148,58	148,66	-	-
26	109,5	109,5	-	-
27	20,21	20,22	-	-
28	25,7	25,7	-	-
29	12,24	12,22	-	-

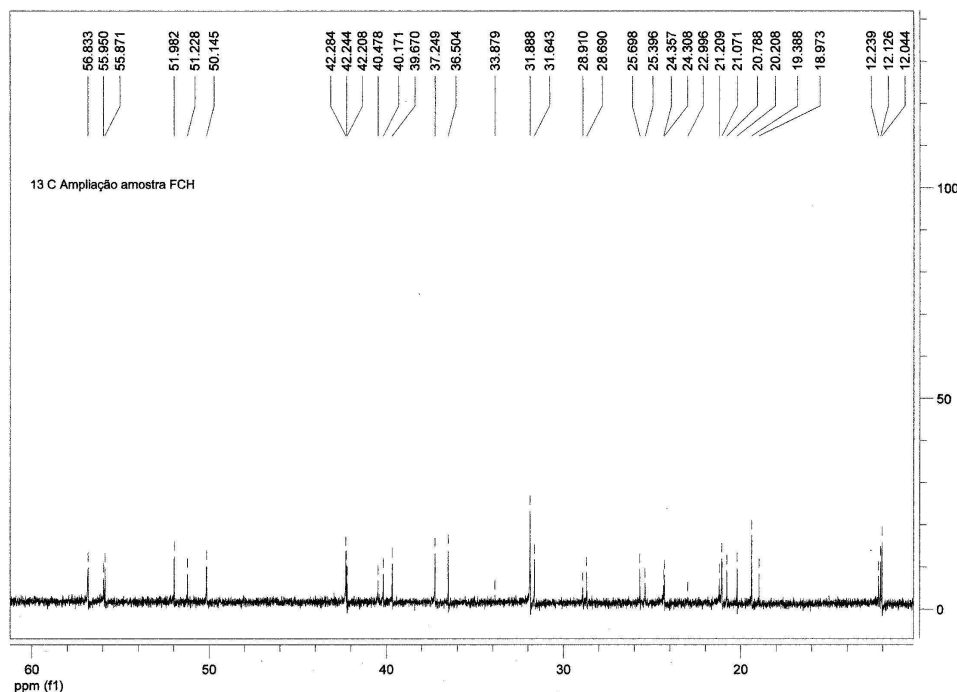


FIGURA 13- DESLOCAMENTO QUÍMICO DO RMN  $^{13}\text{C}$  DA MISTURA DE ESTERÓIDES

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou um dubleto  $\delta$  5,34, o qual corresponde ao sinal do hidrogênio olefínico ligado ao carbono 6; o multiplete em  $\delta$  3,51 corresponde ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono 3. Estes sinais confirmam a presença do  $\beta$ -sitosterol (ABDELNUR,2006).

A presença do estigmasterol foi caracterizada pelos sinais de dois duplo dubletos, em  $\delta$  5,05, com  $J = 15,1$  Hz e  $J = 8,1$  Hz, referente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 23; e em  $\delta$  5,11, com  $J = 15,4$  Hz e  $J = 8,0$  Hz, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 22. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 12) mostrou um sinal em  $\delta$  71,79 referente ao carbono carbinólico da posição 3; dois sinais em  $\delta$  140,73 e  $\delta$  122,1 correspondentes aos carbonos 5 e 6, respectivamente; e dois sinais em  $\delta$  129,2 e  $\delta$  138,2 referentes aos

carbonos 23 e 22, respectivamente. Estes sinais comprovam a presença do Sitosterol e do Estigmasterol (ABDELNUR, 2006).

### 5.7.2 Identificação do composto 2

Através dos resultados obtidos no RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  do isolado 2, da fração clorofórmio da casca de *Dalbergia brasiliensis*, e pela comparação com dados da literatura, pode-se concluir que este composto representa uma mistura de dois isoflavonóides: afrormosina e fujikinetina, os quais têm suas estruturas químicas ilustradas na figura 14.

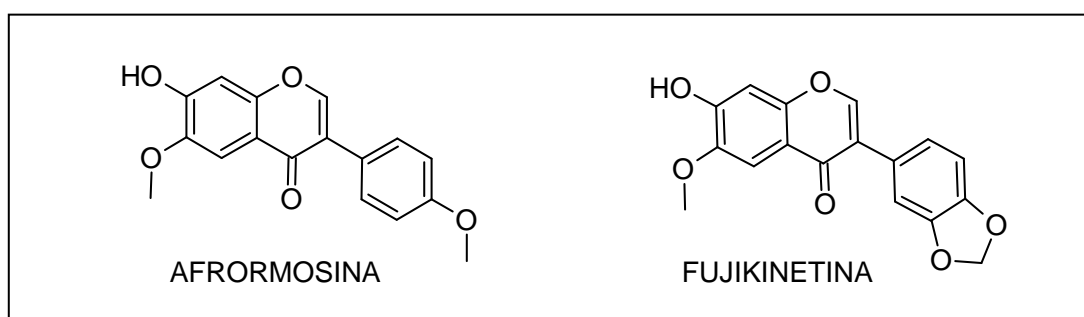


FIGURA 14- ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ISOFLAVONOIDES AFRORMOSINA E FUJIKINETINA IDENTIFICADOS NO ISOLADO 2

Puebla e colaboradores (2010) durante o estudo dos extratos da casca de *Dipteryx alata* (Leguminosae-Papilionoideae) isolou quatro lupano tipo triterpenóides e nove isoflavonóides: afrormosin, 8-O-methylretusin, 7-hidroxi-5, 6,4'-trimethoxyisoflavone, 7-hidroxi-8, 3', 4'-trimethoxyisoflavone, 7,3'-di-hidroxi-8, 4'-dimethoxyisoflavone, odoratin, 7,8,3'-tri-hidroxi-4'-metoxiisoflavona, 7,8,3'-tri-hidroxi-6, 4'-dimethoxyisoflavone, dipteryxin; uma chalcona; um aurona e três compostos fenólicos. As suas estruturas químicas foram elucidadas por técnicas espectroscópicas e o deslocamento químico do isoflavonóide afrormosin foi utilizado como comparação neste estudo conforme apresentado na tabela 13.

A afrormosina ou afrormosin é um isoflavonóide que foi descrito pela primeira vez por McMurray (1960) quando então realizou seu isolamento e caracterização química a partir da *Afromosia elata*, daí o termo de origem.

Estudos químicos com outras espécies vegetais, incluindo *Mendicago sativa* (KESSMANN et al., 1990), *Wistaria brachybotris* (KONOSHIMA et al., 1992)

*Tephrosia calophylla* (REDOX *et al.*, 2009), *Amburana cearensis* (LOPES, 2010), mostraram também a presença de afrormosina em diferentes órgãos vegetais como raiz, casca, folhas e flores.

TABELA 13- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DO AFRORMOSINA

Posição	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	
	Experimento	PUEBLA (2010)	Experimento	PUEBLA (2010)
2	152,17	152,8	8,32 s	8,29
3	123,08	124,7	-	-
4	174,69	174,2	-	-
5	103,29	104,6	7,44 s	7,42
6	147,43	146,9	-	-
7	153,23	152,7	-	-
8	103,29	102,8	6,96 s	6,93
9	152,17	151,7	-	-
10	116,6	116,2	-	-
1'	122,78	122,6	-	-
2'	130,51	130	7,50-7,53 dd	7,5
3'	114,05	113,5	6,96-7,00 dd	6,94
4'	159,35	158,9	-	-
5'	114,04	113,5	6,96-7,00 dd	6,94
6'	130,51	130	7,50-7,53 dd	7,58
OCH <sub>3</sub> 4'	55,59	55,1	3,79	3,77
OCH <sub>3</sub> 6	56,78	55,7	3,68	3,86

Existe na literatura poucos estudos acerca do afrormosin, entre eles estão a atividade antiproliferativa em células carcinogênicas pulmonares de rato (KONOSHIMA *et al.*, 1992), indutora da expressão genética em células de carcinoma mamário e endometrial humana (HALABALAKI *et al.*, 2006), atividade contra bloqueio neuromuscular do veneno de *Bothrops jararacussu* (PUEBLA *et al.*, 2010) e atividade antioxidante através da peroxidação lipídica determinada pelo método de oxidação do ácido linoleico (TODA E SHIRATAKI, 1999).

Para identificação do composto foi utilizado o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , conforme espectro na figura 15, por meio da solubilização do isolado em DMSO, à 200MHz. Os sinais apresentaram-se na região de 55 a 174 ppm.

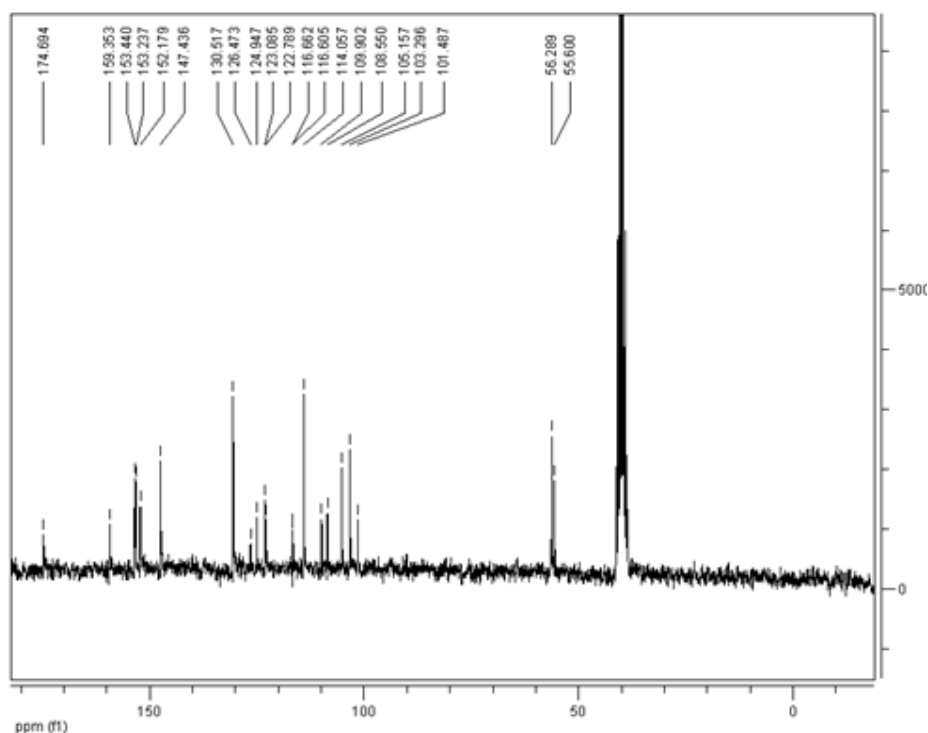


FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DA MISTURA DOS ISOFLAVONOIDES

No isoflavonóide afrormosina constam radicais metoxila no carbono de posição 4' e 6 com valor de 55,59 e 56,78 ppm respectivamente, conforme espectro da Figura 16.

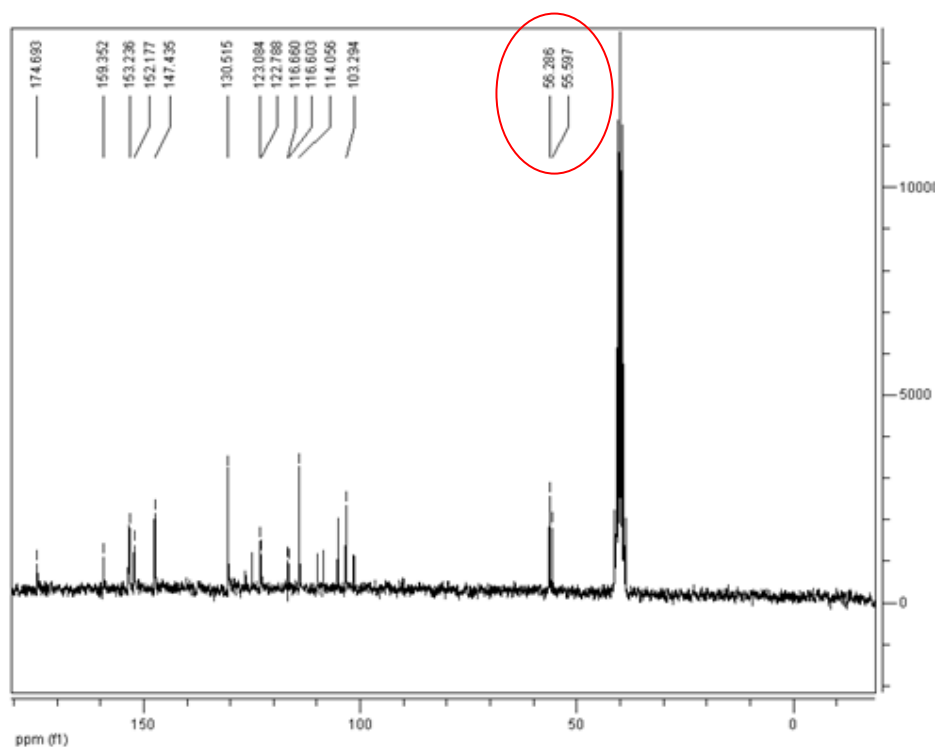


FIGURA 16- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO AFRORMOSINA

No fujikinetin, a metoxila está presente no carbono 6, com 55,59 ppm, e a posição 3',4' da estrutura está o grupamento metilenodioxi, representado pelo valor de 101,48 ppm do espectro (Figura 17).

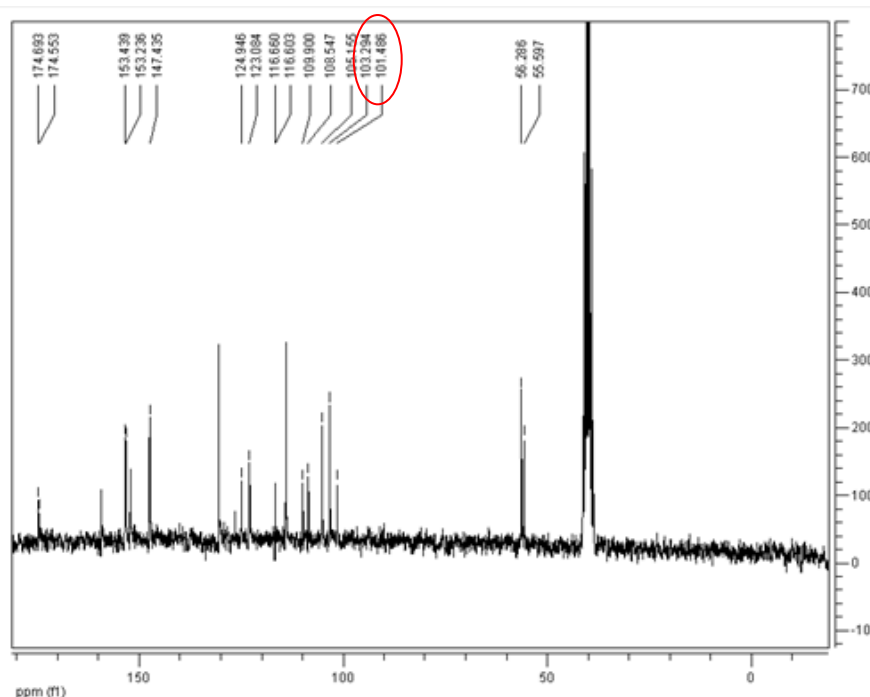


FIGURA 17- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO FUJIKINETINA

Através do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT é possível evidenciar a ligação dos carbonos presentes na molécula. Na Figura 18 pode-se visualizar os carbonos C-H, na porção inferior do espectro com os sinais em 130, 114, 105, 103.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 1, caracterizado pela mistura dos isoflavonóides (Figura 19), observou-se todos os deslocamentos na região de 6,05 a 8,33 ppm, região característica de compostos aromáticos e heteroaromáticos. Na figura 20, RMN  $^1\text{H}$  da Afrormosina é possível identificar as metoxilas presentes com o valor de 3,88 e 3,79 ppm e o grupamento metilenodioxi da Fujikinetina em 6,05 ppm na figura 21. O pico em 2,5 ppm representa o solvente DMSO.

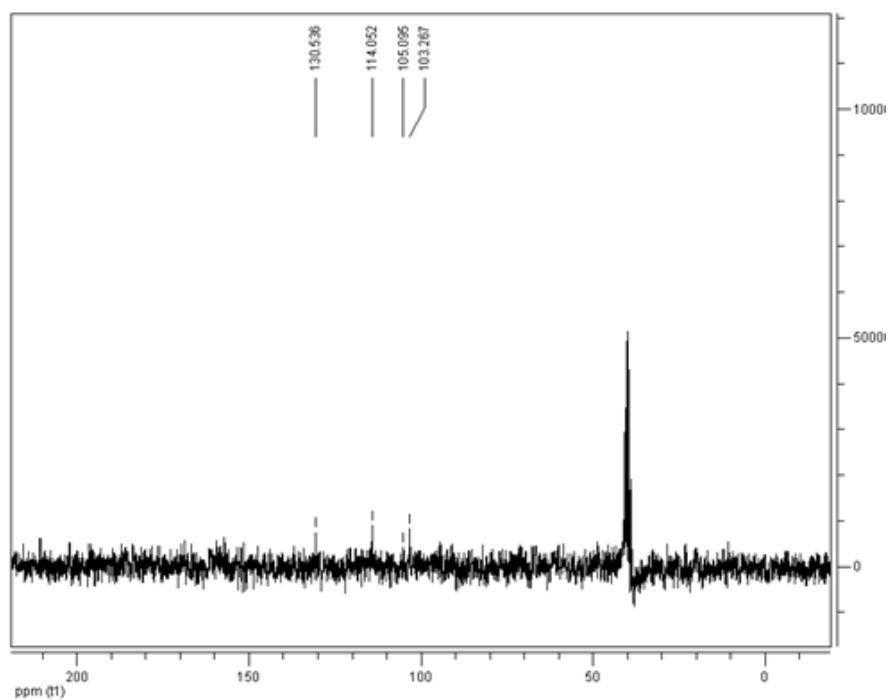


FIGURA 18 - DEPT DO COMPOSTO 1 (AFRORMOSINA E FUJIKINETINA)

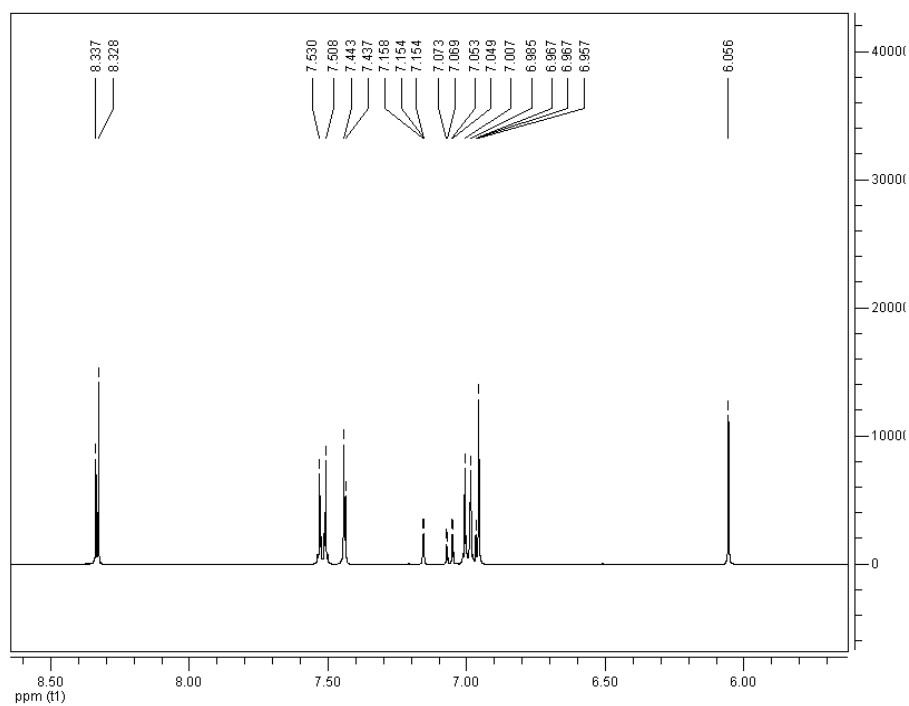
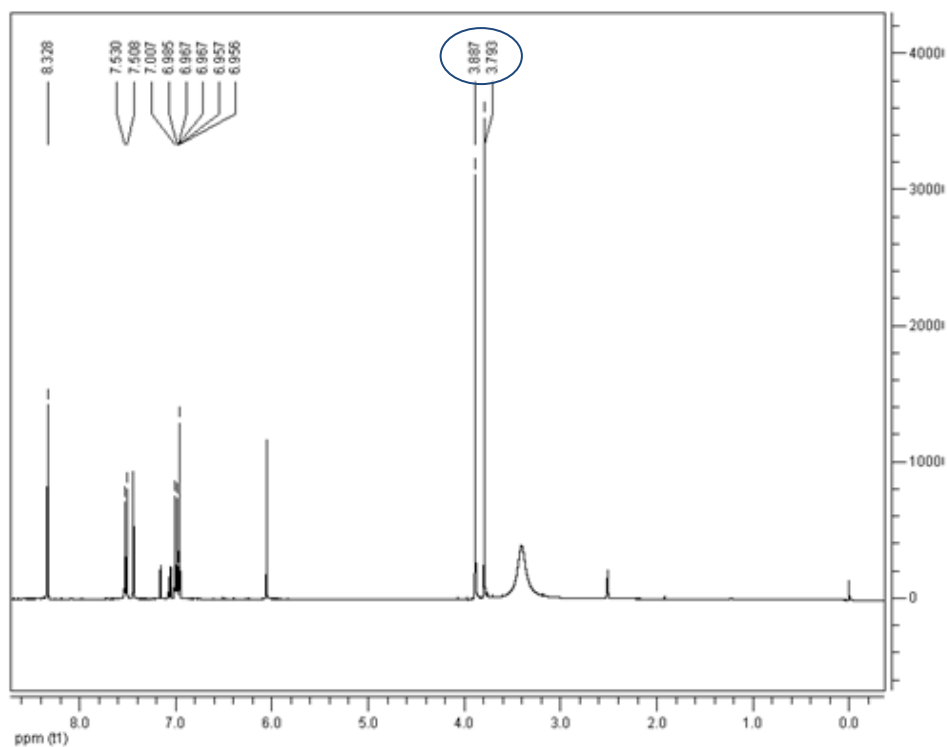
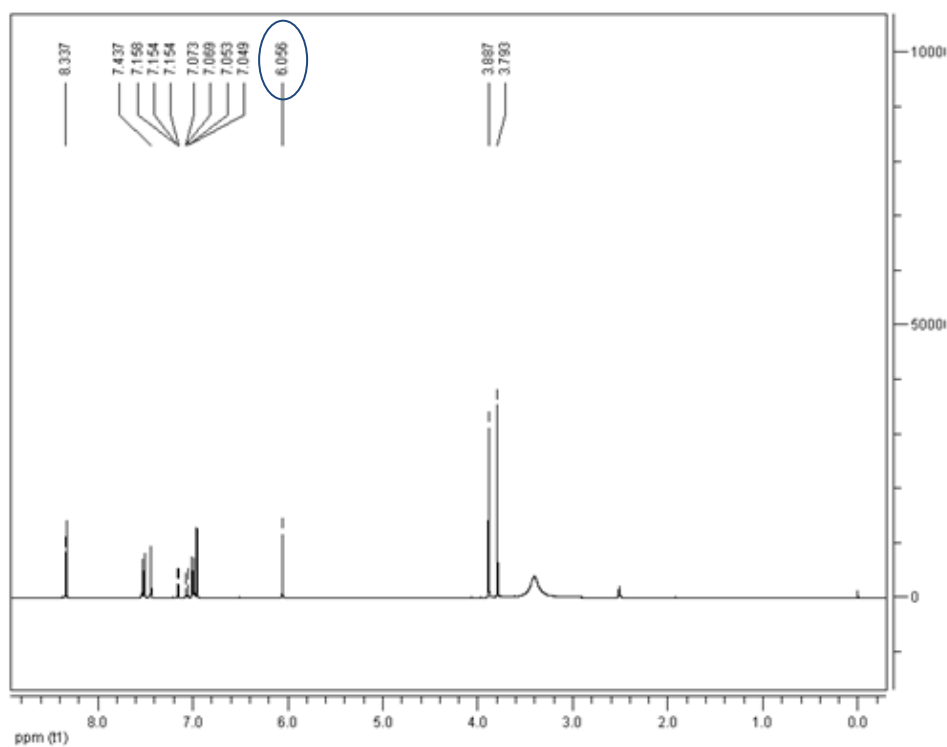


FIGURA 19- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DA MISTURA DOS ISOFLAVONOIDES



FIGURA 20- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO AFRORMOSINAFIGURA 21- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO FUJIKINETINA

Os resultados do deslocamento químico da RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  do isoflavonóide fujikinetina podem ser observados na tabela 14 e 15 que ao comparar com Rao (2010), Velozo (1999), Marques (1997) e Lessen (1994) possuem valores muito próximos.

TABELA 14- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO FUJIKINETINA

Posição	$^{13}\text{C}$		
	Experimento	RAO (1983)	VELOZO (1999)
2	153,23	152,95	153,28
3	123,08	122,63	122,8
4	174,55	174,16	174,25
5	105,15	104,7	104,8
6	147,43	146,8	147,5
7	153,43	151,7	155,18
8	103,29	102,72	103,48
9	153,23	152,83	151,58
10	116,66	116,13	117,79
1'	124,94	125,91	124,6
2'	109,9	109,37	109,38
3'	147,43	146,93	146,98
4'	147,43	146,93	146,9
5'	108,54	108,63	108,09
6'	123,08	122,28	122,35
OCH <sub>2</sub> O	101,48	100,97	101,03
OCH <sub>3</sub>	55,59	55,79	55,86

Existem poucos estudos na literatura sobre o isoflavonóide fujikinetina. Este já havia sido identificado na espécie *Dalbergia frutescens*. KHAN e colaboradores (2000), isolaram várias isoflavonas na *D. frutescens* como formononetina, castanina, odorantina, gliciteína, pseudobaptogenin, fujikinetina e cuneatina, e testaram suas atividades antiprotozoários contra *Giardia intestinalis*. Entre estes compostos, a formononetina foi o agente anti-giardial mais potente com um valor de IC<sub>50</sub> de 30 ng/ml em comparação com o metronidazol, fármaco usualmente utilizado. O fujikinetin foi o terceiro mais ativo com IC<sub>50</sub> de 1,5 ng/ml.

TABELA 15- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>1</sup>H DO FUJIKINETINA

Posição	<sup>1</sup> H			
	Experimento	RAO (1983)	MARQUES (1997)	LENSSEN (1994)
2	8,33	8,3	7,94	8,37
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	7,43	7,44	7,74	7,38
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	7,04 J=0,31	6,94	7,22	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,15dd J=0,31	6,8-7,2 (m)	6,7-7,1 (m)	7,13
3'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5'	7,07d J=2	6,8-7,2 (m)	6,7-7,1 (m)	6,96
6'	7,05d J=2	-	6,7-7,1 (m)	7,05
OCH <sub>2</sub> O	6,05	6,04	6	6,04
OCH <sub>3</sub>	3,79	3,88	3,95	3,8

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser de origem natural ou sintética e podem ser adicionados em produtos alimentícios, cosméticos e outros para retardar os processos oxidativos, que causam mudanças na qualidade e aspecto dos produtos. Os antioxidantes atuam interrompendo a cadeia de reações oxidativas, reduzindo a velocidade de oxidação e prolongando o período de indução, que consiste no tempo decorrido para um produto começar a apresentar sinais detectáveis de oxidação (AMAROWICZ *et al.*, 2004).

Atualmente pesquisas estão voltadas em busca de produtos antioxidantes naturais, pois existem dúvidas em relação à segurança dos produtos sintéticos utilizados no mercado.

### 5.8.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

A Formação do Complexo Fosfomolibdênico baseia-se na redução do molibdênio quando em contato com alguma substância que tenha ação antioxidante, com formação de um complexo verde fosfomolibdênico em pH ácido, que é determinado espectrofotometricamente por UV a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Esse método é usado para comparar a capacidade antioxidante de diversos extratos, além de ser simples e de baixo custo.

A atividade antioxidante de cada amostra (fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e extrato bruto da casca e da folha) foi calculada em relação à vitamina C e rutina, atividades consideradas 100%. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 16.

TABELA 16– RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

Parte vegetal	Amostra	Atividade Antioxidante em relação à Vitamina C (%)	Atividade Antioxidante em relação à Rutina(%)
Casca	Extrato Bruto	13,232	50,937
	Hexano	17,608	73,981
	Cloroformio	24,578	105,015
	Acetato de Etila	28,980	123,824
Folha	Extrato Bruto	11,677	45,781
	Hexano	26,225	102,812
	Cloroformio	48,465	190
	Acetato de Etila	23,910	93,75

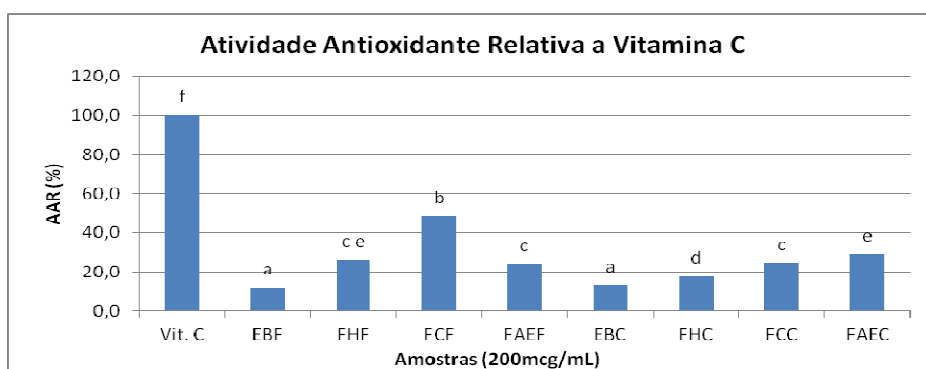
De acordo com os dados obtidos é possível concluir que todas as frações testadas, apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio. Nas amostras da casca, considerando as atividades da rutina e vitamina C como referências, as frações acetato de etila e clorofórmio demonstraram maior atividade, e quando comparados à rutina, se mostraram mais ativas que este padrão.

Nas amostras da folha, a fração clorofórmio representou cerca de 48% da atividade da vitamina C. As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila,

demonstraram atividade antioxidante similar e/ou maior que o padrão rotina. Desta forma essas frações podem ser consideradas antioxidantes em potencial.

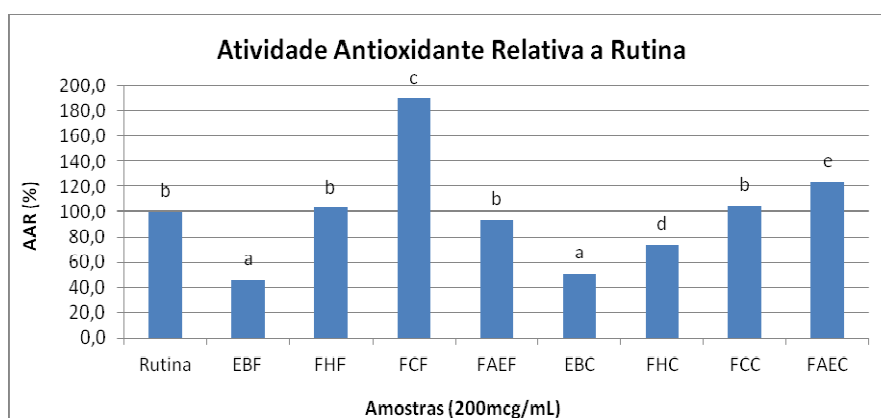
Os resultados podem ser melhores visualizados pelos Gráficos 1 e 2 os quais demonstram a porcentagem de inibição do complexo do fosfomolibdênio relacionado com a Vitamina C e com a Rutina respectivamente. Para verificar diferença estatística entre as amostras aplicou-se Anova, e para localização das diferenças o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no índice antioxidante.

**GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS RELATIVAS À VITAMINA C**



Nota: Vit.C=Vitamina C, EBF=extrato bruto folha, FHF=fração hexânica folha, FCF= fração clorofórmio folha, FAEF=fração acetato de etila folha, EBC=extrato bruto casca, FHC=fração hexânica casca, FCC=fração clorofórmio casca, FAEC=fração acetato de etila casca.

**GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS RELATIVAS À RUTINA**



Nota: EBF=extrato bruto folha, FHF=fração hexânica folha, FCF= fração clorofórmio folha, FAEF=fração acetato de etila folha, EBC=extrato bruto casca, FHC=fração hexânica casca, FCC=fração clorofórmio casca, FAEC=fração acetato de etila casca.

A Figura 22 apresenta a visualização da reação de complexação com o fosfomolibdênio em triplicata.

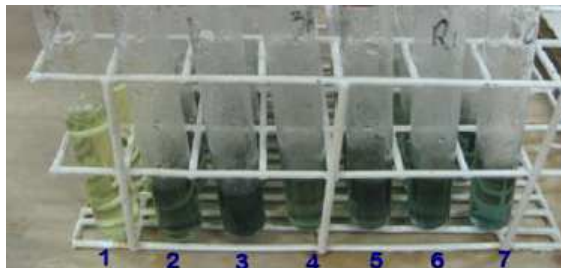


FIGURA 22 - REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO/FOLHA

Nota: [1]=branco [2]=hexano [3]=extrato bruto [4]= clorofórmio [5]= acetato de etila [6]=rutina [7]= vitamina C

#### 5.8.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica através de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico

Nos testes utilizando as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), ocorre a avaliação do ponto final da peroxidação lipídica, ao mensurar a substância malonildialdeído, que resulta neste processo, permitindo avaliar os efeitos do estresse oxidativo induzido e da proteção da lipoperoxidação pelas substâncias antioxidantes que possam estar presentes no material analisado (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005). Nestes testes a mensuração da peroxidação lipídica de matrizes biológicas é realizada pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonildialdeído, em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, gerando um cromóforo rosado que pode ser medido espectrometricamente (MIYATA; SMITH, 1996; KELLER *et al.*, 2000; DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005).

As amostras avaliadas obtidas das folhas e cascas do caule da *Dalbergia brasiliensis* demonstraram atividade antioxidante pelo teste TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico), expressa como índice antioxidante (IA) em porcentagem, demonstrado na Tabela 17.

Para as folhas, destaca-se a fração hexano (51,57 % + 2,53) que apresentou elevado índice antioxidante, não diferindo significativamente com o padrão BHT, segundo estatística.

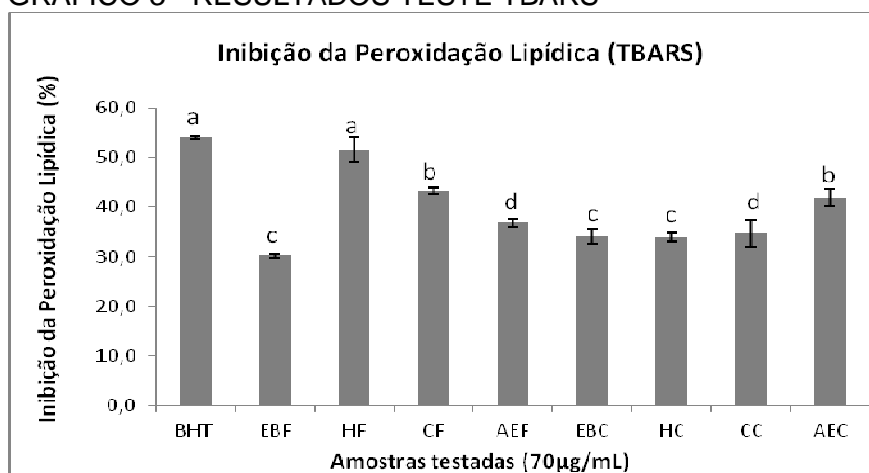
TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO TESTE TBARS COMO ÍNDICE ANTIOXIDANTE (IA) EM PORCENTAGEM (%)

Parte vegetal	Amostras (1000ppm)	IA %	DP	Teste de Tukey
Folha	BHT	54,03	0,2843	A
	Extrato bruto	30,16	0,5836	c
	Hexano	51,57	2,5350	A
	Cloroformio	43,21	0,7083	B
	Acetato de Etila	36,88	0,7590	D
Casca	Extrato bruto	34,12	1,5618	C
	Hexano	33,95	0,8903	C
	Cloroformio	34,70	2,6560	D
	Acetato de Etila	41,87	1,7351	B

Nota: IA = Índice de atividade antioxidante expresso em porcentagem (%), referente à média das repetições. DP=desvio padrão. BHT=butil hidroxi tolueno. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no índice da atividade (IA) entre as diversas amostras em relação à mesma concentração ( $p < 0,05$ , utilizando ANOVA e teste de Tukey).

As frações cloroformio da folha (43,21+0,70) e acetato de etila da casca (41,87+1,73) iguais estatisticamente, também apresentaram atividade antioxidante elevada. Os resultados também estão demonstrados no Gráfico 3.

GRÁFICO 3 - RESULTADOS TESTE TBARS



Nota: BHT=butil hidroxi tolueno EBF=extrato bruto folha, HF=fração hexanica folha, CF=fração clorofórmio folha, AEF=fração acetato de etila folha, EBC=extrato bruto casca, HC=fração hexanica casca, CC=fração clorofórmio casca, AEC=fração acetato de etila casca. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no índice da atividade (IA) entre as diversas amostras em relação à mesma concentração.

### 5.8.3 Redução do radical DPPH

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizado por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (ALVES *et al.*, 2010).

O DPPH quando entra em contato com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, o radical passa à sua forma reduzida perdendo a coloração violeta e se tornando amarelo pálido, formando difenil picrilhidrazina. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (ALVES *et al.*, 2010).

Para cada amostra testada foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC50, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Os Gráficos 4 e 5 correspondem aos padrões e os Gráficos de 6 a 13 apresentam as retas médias obtidas para cada teste.

GRÁFICO 4- CURVA DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH

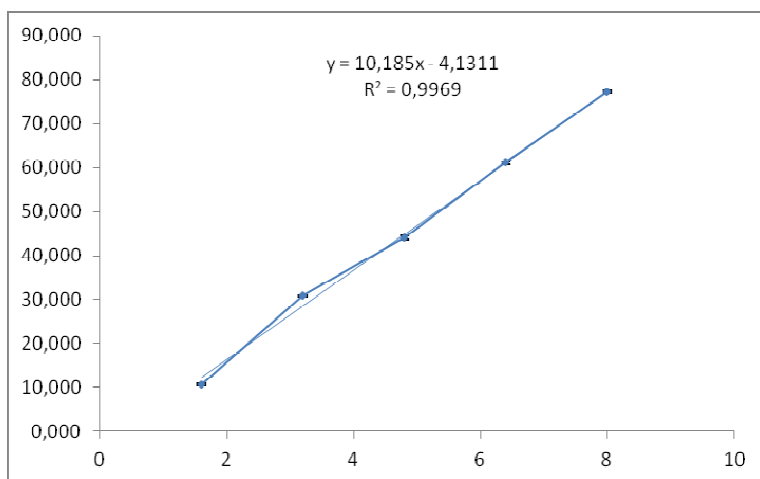




GRÁFICO 5- CURVA DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH

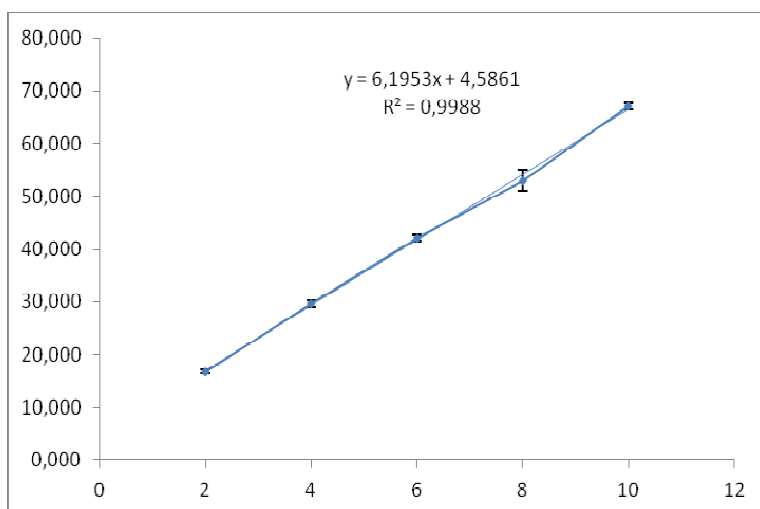


GRÁFICO 6- CURVA DO EXTRATO BRUTO DA FOLHA PELA REDUÇÃO DO DPPH

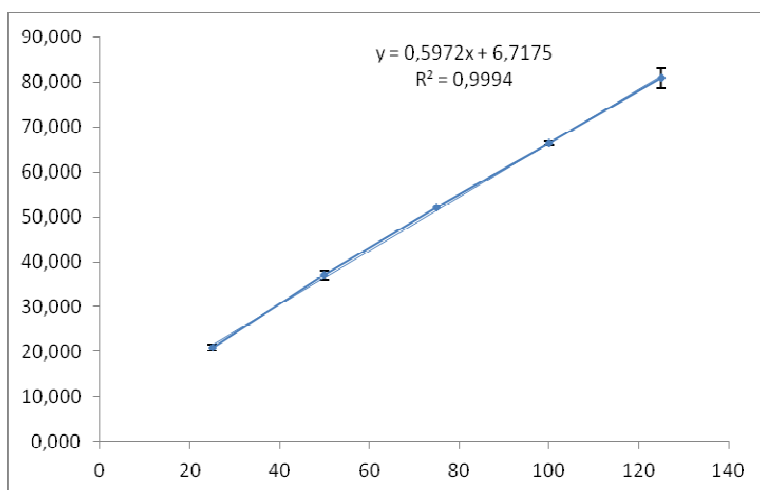


GRÁFICO 7- CURVA DA FRAÇÃO HEXANO DA FOLHA PELO REDUÇÃO DO DPPH

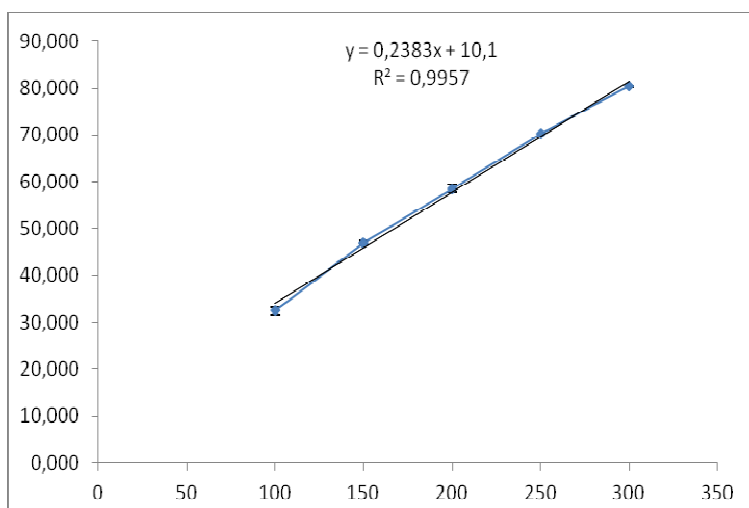


GRÁFICO 8- CURVA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO DA FOLHA PELA REDUÇÃO DPPH

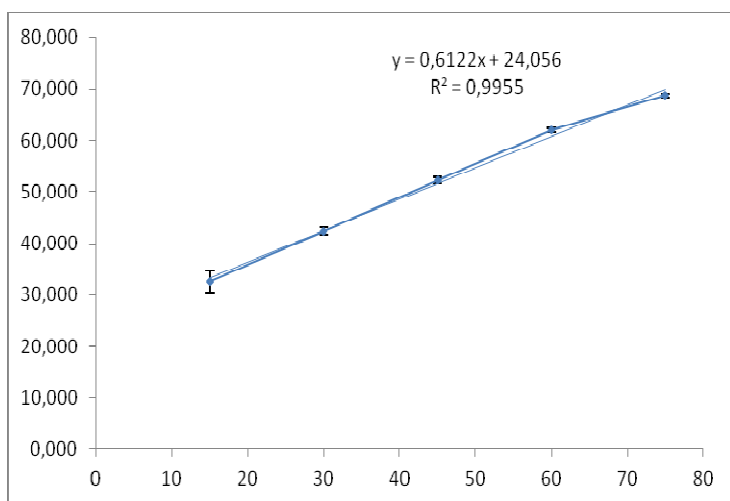


GRÁFICO 9- CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA FOLHA PELA REDUÇÃO DPPH

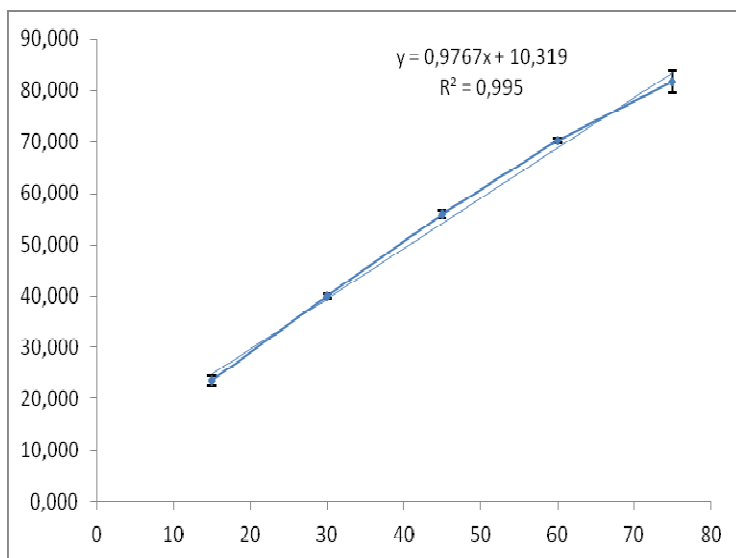


GRÁFICO 10 - CURVA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA PELA REDUÇÃO DO DPPH

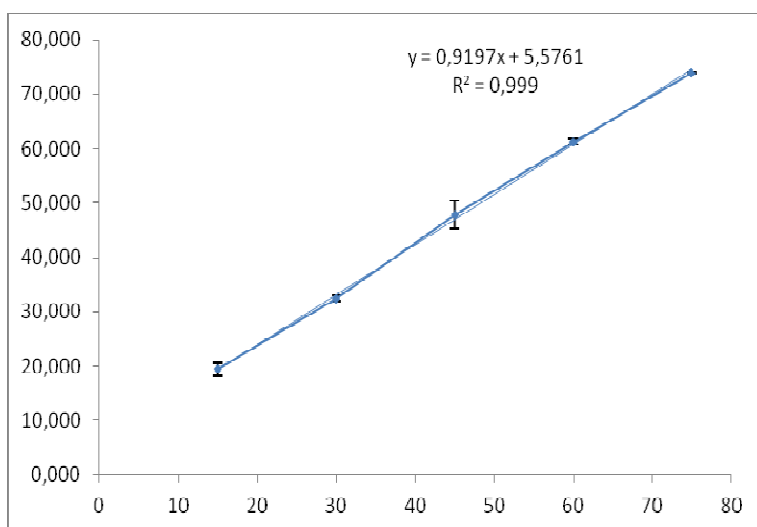


GRÁFICO 11 - CURVA DA FRAÇÃO HEXANO DA CASCA PELA REDUÇÃO DO DPPH

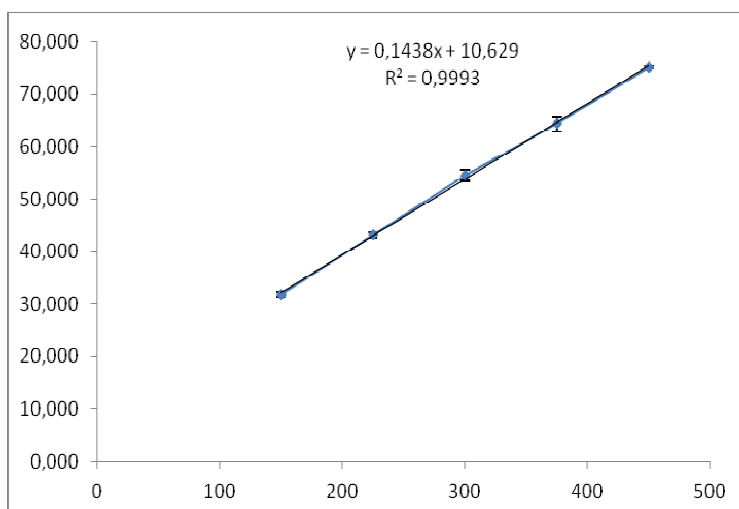


GRÁFICO 12 - CURVA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO CASCA PELA REDUÇÃO DO DPPH

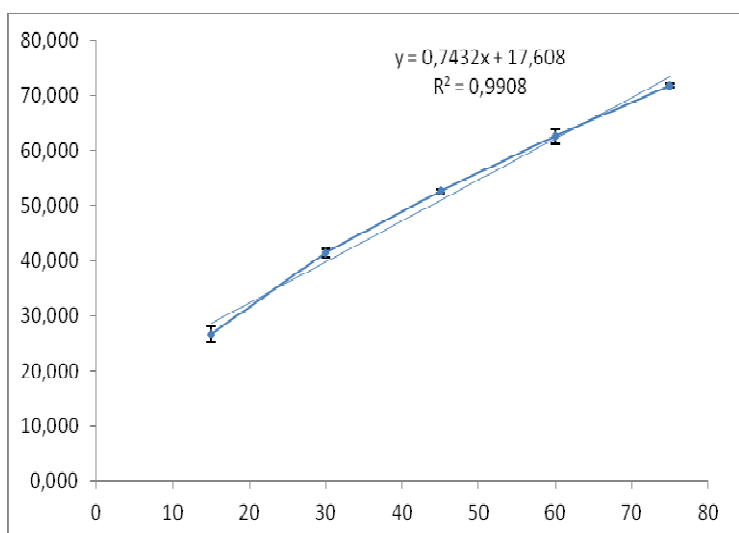
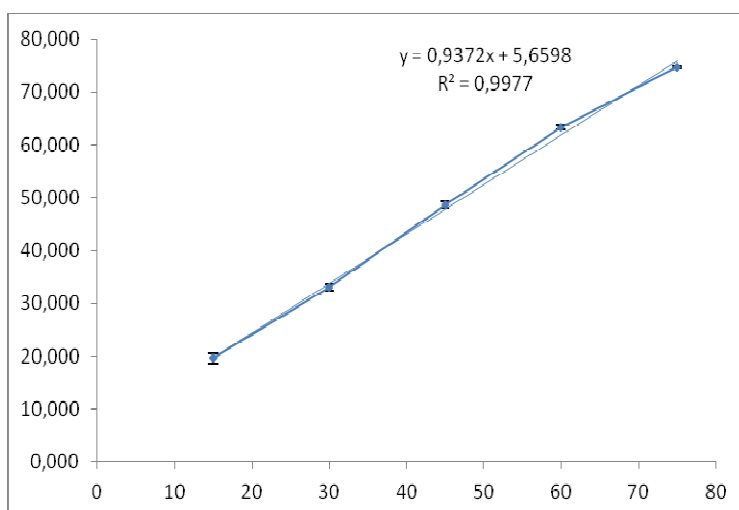


GRÁFICO 13- CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA CASCA PELA REDUÇÃO DPPH



Na Figura 23 está demonstrada a perda de coloração quando a fração possui capacidade antioxidante. Os resultados do IC<sub>50</sub> são apresentados na Tabela 18, corresponde à média das repetições  $\pm$  desvio padrão.



FIGURA 23- ANÁLISE DPPH DA FRAÇÃO CLOROFORMIO DA FOLHA  
Fonte: Autora, 2012

TABELA 18- RESULTADO DE IC<sub>50</sub> E TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH

Amostras	Média IC <sub>50</sub> ( $\mu$ m) $\pm$ DP	Resultado do Teste de Tukey
Vitamina C	4,5036 $\pm$ 0,0507	f
Rutina	7,3307 $\pm$ 0,1168	f
Extrato bruto folha	72,4761 $\pm$ 1,0293	a
Hexano folha	165,6026 $\pm$ 2,1437	b
Cloroformio folha	42,3437 $\pm$ 1,1240	c
Acetato de Etila folha	40,6292 $\pm$ 0,1384	c
Extrato bruto casca	48,3035 $\pm$ 0,6064	d
Hexano casca	273,8684 $\pm$ 2,1608	e
Cloroformio casca	43,5723 $\pm$ 1,0178	c
Acetato de etila casca	47,3102 $\pm$ 0,1298	d

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam as diferenças significativas. Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

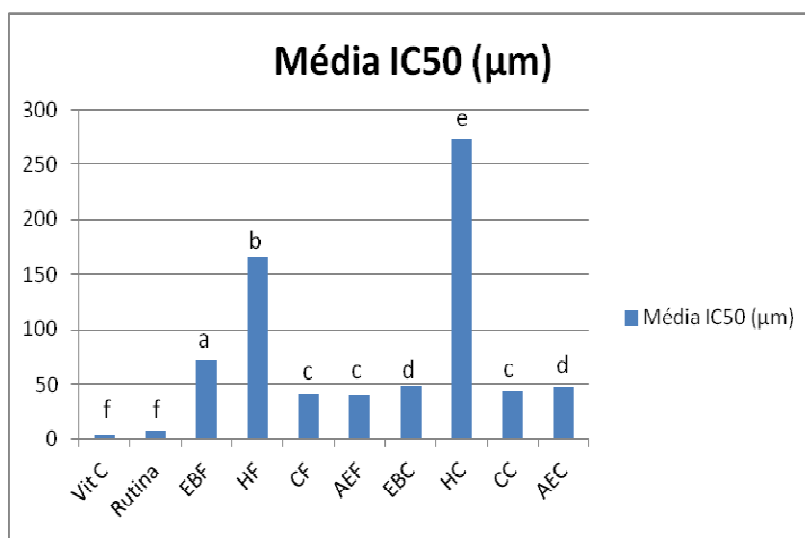
Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Todas as amostras testadas possuem atividade antioxidante menor que a vitamina C e rutina, representadas estatisticamente pela letra f, conforme Gráfico 14. As amostras clorofórmio da folha, acetato de etila da folha e cloroformio da casca demonstraram que são iguais estatisticamente (letra c, conforme gráfico), com os respectivos resultados: 42,3437 $\pm$ 1,1240; 40,6292 $\pm$ 0,1384; 43,5723 $\pm$ 1,0178. Este valor significa que é necessária esta concentração para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

As frações hexano apresentaram atividade antioxidante acima de 160 µg/mL, sendo considerada uma atividade fraca, são menos ativas do que os padrões e amostras analisadas, sendo necessário uma quantidade maior de amostra para reduzir 50% da concentração de DPPH.

As amostras extrato bruto e acetato de etila da casca mostraram iguais estatisticamente,  $48,3035 \pm 0,6064$  e  $47,3102 \pm 0,1298$  respectivamente.

GRÁFICO 14- IC<sub>50</sub> DAS AMOSTRAS ANALISADAS



## 5.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL<sub>50</sub>) (MEYER *et al.*, 1982).

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida. Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

Para o cálculo da DL<sub>50</sub> os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico Probitos, e estão apresentados na Tabela 19 (FINNEY,1971).

TABELA 19- MORTALIDADE DE *Artemia salina* E DL<sub>50</sub>

Amostra	Mortalidade/Concentração			DL <sub>50</sub> (µg/ml)	Intervalo de Confiança de 95% (µg/ml)
	10(µg/ml)	100(µg/ml)	1000(µg/ml)		
Extrato Bruto/ folha	5	13	15	>1000	–
Hexano/ folha	6	15	10	>1000	–
Cloroformio/ folha	8	8	12	>1000	–
Acetato de Etila/ folha	12	15	24	>1000	–
Extrato Bruto/ casca	1	9	11	>1000	–
Hexano/ casca	11	14	14	>1000	–
Cloroformio/ casca	11	15	21	>1000	–
Acetato de Etila/ casca	8	9	17	>1000	–
Sulfato de quinidina	9	45	85	95,77	70,14-130,78

Observando os dados é possível perceber que nenhuma das amostras se mostrou ativa contra o micro crustáceo *Artemia salina*, pois todas apresentaram um resultado de DL<sub>50</sub> superior a 1000 µg/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982). Os controles feitos com o solvente metanol não apresentaram influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu na presença dos mesmos, do mesmo modo que o controle realizado com água salgada. Dessa maneira pode-se dizer que as frações do extrato da *Dalbergia brasiliensis* não possuem toxicidade frente ao teste realizado.

## 5.10 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA

### 5.10.1 Avaliação Hemolítica em Placas de Ágar Sangue

Os resultados da avaliação da atividade hemolítica do extrato bruto e frações das folhas e cascas da *Dalbergia brasiliensis*, aplicada com o objetivo de verificar hemólise produzida pelas amostras, em meio de ágar sangue, confirmaram o resultado negativo. Observou-se que para o teste de difusão em discos não se

formaram halos de hemólise nas amostras testadas e nos padrões dos solventes utilizados, não representando atividade hemolítica de acordo com a Figura 25-A. O resultado negativo no ensaio de atividade hemolítica indica não toxicidade nesse modelo de ensaio. O resultado negativo é interessante pois justifica mais pesquisas para o uso dos extratos e frações desta espécie como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal. A saponina, Figura 24-B, foi utilizada como padrão positivo.

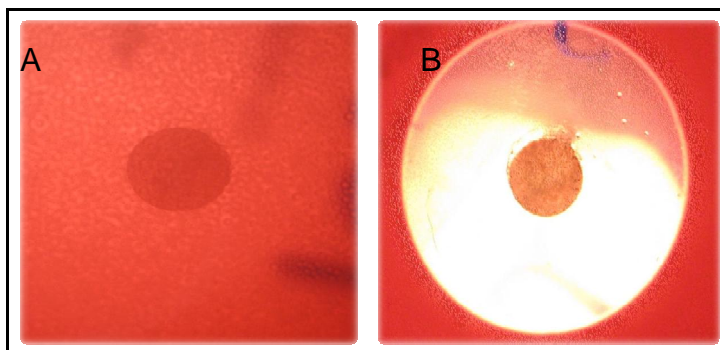


FIGURA 24- RESULTADOS ATIVIDADE HEMOLÍTICA [A] RESULTADO NEGATIVO, FRAÇÕES E EXTRATOS BRUTOS E [B] RESULTADO POSITIVO, PADRÃO SAPONINA.  
Fonte: Autora, 2012

#### 5.10.2 Avaliação Hemolítica em tubos

Foram testados para este ensaio os Extratos Brutos e frações das cascas e das folhas da *Dalbergia brasiliensis*. Para a realização deste foi necessário preparar a diluição em série em 4 concentrações (0,1  $\mu\text{L}$ ; 0,2  $\mu\text{L}$ ; 0,5  $\mu\text{L}$  e 1,0  $\mu\text{L}$ ) das amostras com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue a 2%. Nas amostras diluídas apenas a fração hexano da casca apresentou hemólise nas concentrações 0,5  $\mu\text{L}$  e 1,0  $\mu\text{L}$ , como mostra a Figura 25. Após este processo a fração hexano foi submetida a outra série de diluições com 15 tubos de ensaios (0,30  $\mu\text{L}$  à 1,0  $\mu\text{L}$ ), onde foi verificada a concentração que produziu hemólise total, ou seja, uma solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos. A fração hexano da casca produziu hemólise a partir da concentração 0,35  $\mu\text{L}$ , demonstrado na Figura 26. A referência para controle positivo do teste foi a saponina.

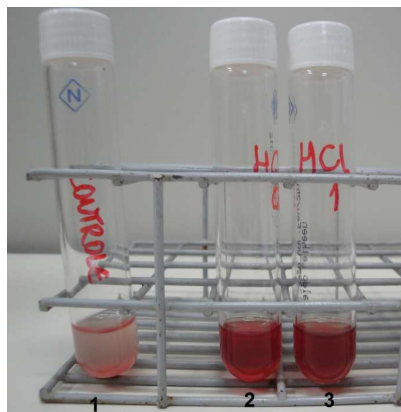


FIGURA 25 - RESULTADO POSITIVO PARA HEMÓLISE NA FRAÇÃO HEXANO CASCA

Nota: [1]= Controle negativo [2]=fração hexano diluída à 0,5µL [3]=fração hexano diluída à 1,0µL

Fonte: Autora, 2012

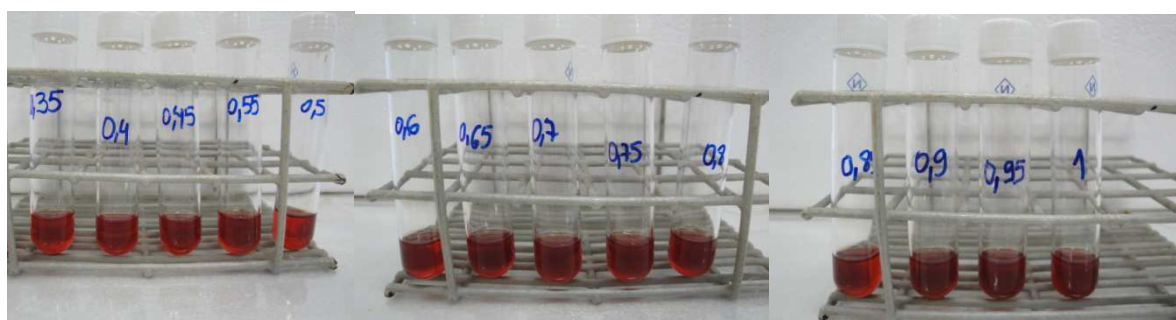


FIGURA 26 - RESULTADO DA DILUIÇÃO EM SÉRIE DA FRAÇÃO HEXANO CASCA

Fonte: Autora, 2012

A Figura 27 mostra o resultado negativo para as outras amostras justificando a continuidade da pesquisa para utilização dos extratos e frações desta espécie como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.



FIGURA 27 - RESULTADO NEGATIVO PARA HEMÓLISE *IN VITRO*

Fonte: Autora, 2012



### 5.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA *Dalbergia brasiliensis* CONTRA MOSQUITO *Aedes aegypti*

Para a mortalidade de *A. Aegypti*, no 3º estágio de desenvolvimento, foi verificado que todos os extratos e frações avaliados provocaram mortalidade das larvas testadas, indicando o efeito larvicida.

Os resultados obtidos para a DL50% e 90% demonstra que a substância 7 (fração clorofórmio da casca) foi mais potente quando comparadas com as demais, uma vez que necessitou de apenas 50 µg/ml para inibir 50% e 25 µg/ml para a inibição de 90% das larvas tratadas (tabela 20).

TABELA 20- DL<sub>50</sub>, DL<sub>90</sub> E MORTALIDADE DE *A. AEGYPTI*, SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *D. BRASILSIS*.

Amostra	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÕES									
	0 (µg/mL)	125 (µg/mL)	250 (µg/mL)	500 (µg/mL)	1000 (µg/mL)	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	DL <sub>90</sub> (µg/mL)	X <sup>2</sup>	GL	DP
1	2	48	49	50	52	30 (26-33)	91 (111-116)	6.86	2	1.34
2	2	46	49	51	52	44 (36- 59)	81 (78-96)	4.32	2	1.26
3	2	46	46	48	48	33 (25-44)	75 (67-81)	4.76	2	1.87
4	2	45	46	47	49	24 (37- 49)	66 (51-78)	4.22	2	1.35
5	2	48	48	47	47	32 (46-89)	71 (66-84)	4.83	2	1.24
6	2	49	50	50	50	31 (29-51)	72 (67-85)	4.23	2	1.17
7	2	48	50	52	55	25 (16-38)	50 (32-68)	4.29	2	1.15
8	2	50	50	49	49	28 (19-33)	93 (115-121)	4.46	2	1.21

Nota:

CL<sub>50</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 50% das larvas expostas, CL<sub>90</sub>: concentração letal que ocasiona a morte de 90% das larvas expostas, X<sup>2</sup>: qui-quadrado, GL: Grau de liberdade, DP: desvio padrão.

Amostra 1: extrato bruto folha, amostra 2: fração hexano folha, amostra 3: fração clorofórmio folha, amostra 4: fração acetato de etila folha, amostra 5: extrato bruto casca, amostra 6: fração hexano casca, amostra 7: fração clorofórmio casca, amostra 8: fração acetato de etila.

Quando o efeito larvicida é comparado pelo teste de Tukey, observou-se que as mortalidades obtidas entre os diferentes extratos não apresentam diferenças significativas entre si (Tabela 21). As diferenças estatísticas são verificadas apenas quando se compara as amostras dos extratos com as amostras do controle.

Alterações morfológicas externas foram verificadas em todas as larvas expostas aos extratos de *D. brasiliensis*, após 24 horas de exposição (Figura 28 A). As principais alterações observadas para os extratos foram: exoesqueleto rígido (FIGURA 28 B e C), de fácil rompimento e alongamento da parte anterior ao tórax (FIGURA 28 D).

TABELA 21 - EFEITO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *D. brasiliensis* NA MORTALIDADE DE *A. aegypti*.

Amostra	Concentrações (µg/mL)				
	0	125	250	500	1000
1	2 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>
2	2 <sup>a</sup>	46 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>	51 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>
3	2 <sup>a</sup>	46 <sup>b</sup>	46 <sup>b</sup>	48 <sup>b</sup>	48 <sup>b</sup>
4	2 <sup>a</sup>	45 <sup>b</sup>	46 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>
5	2 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>	48 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>
6	2 <sup>a</sup>	49 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>
7	2 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>	55 <sup>b</sup>
8	2 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup>

**Nota:** Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

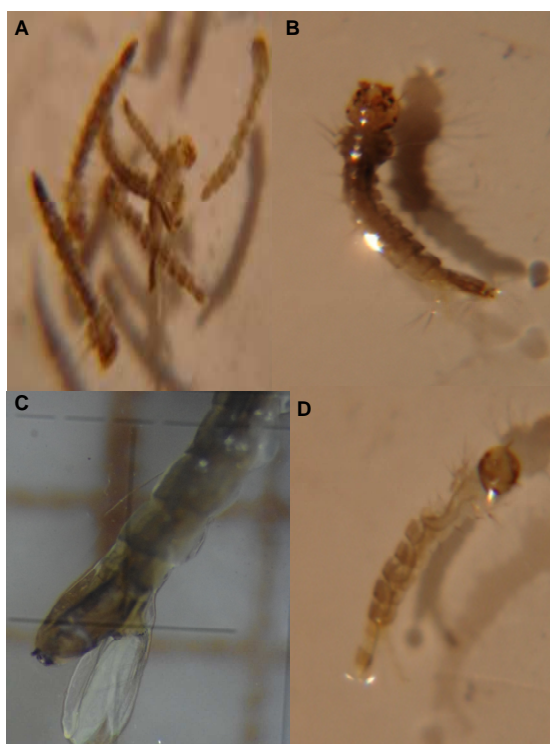


FIGURA 28- LARVAS DE *Aedes aegypti* COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS PELOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *D. brasiliensis*.

NOTA: A: Visão geral das larvas; B e C: Exoesqueleto rígido e de fácil rompimento, D: alongamento da parte anterior ao tórax.

A resistência de populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas, a utilização de inseticidas convencionais com problemas ambientais e toxicidade aos organismos vivos e a ineficácia de combate ao vetor, tem despertado a necessidade de

desenvolvimento de compostos eficazes no combate aos vetores da dengue e que minimizem ou evitem os problemas atuais (Garcez et. al., 2009).

Apesar de alterações morfológicas terem sido claramente observadas no presente trabalho, são necessários estudos específicos como microscopia eletrônica de varredura para elucidar as alterações externas causadas pelos extratos e frações aqui investigados. Chaithong *et al.* (2006) verificando alterações morfológicas em larvas de *A. aegypti* expostas a extratos etanólicos de três espécies de Piperaceae, observou que a maioria dos órgãos apresentava aparência estrutural normal, exceto as papilas anais (brânquias).

Através de estudos ultra-estruturais os autores verificaram a destruição da cutícula nas papilas anais, indicando que o efeito tóxico do extrato etanólico de Piperaceae é predominantemente sobre as papilas anais, levando a sua deformação morfológica.

Nos dados obtidos da mortalidade acumulada e corrigida, foi verificado que mesmo a menor concentração de 125 µg/ml foi capaz de causar mortalidade superior a 50%. Maior efeito foi verificado para a concentração de 125 µg/ml da fração clorofórmio das cascas, substância 7. Com base nos resultados aqui obtidos, pode-se inferir que os extratos e frações de *D. brasiliensis* podem atuar como pesticidas no controle de vetores da dengue (tabela 22).

TABELA 22- MORTALIDADE ACUMULADA E CORRIGIDA DE LARVAS DE *A. aegypti*, SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *D. brasiliensis*.

Extrato	Mortalidade Acumulada	Mortalidade corrigida	Média + desv. Pad.
1	78.12	77.38	10.25±1.40 <sup>b</sup>
2	82.23	80.95	14±1.15 <sup>b</sup>
3	71.87	69.04	12 ±0.17 <sup>b</sup>
4	67.81	65.07	10.75±1.70 <sup>b</sup>
5	95.65	70.23	11.25±2.21 <sup>b</sup>
6	78.91	76.78	9.5± 2.38 <sup>b</sup>
7	86.78	83.80	1.33±0.70 <sup>a</sup>
8	78.61	77.38	9.33±1.52 <sup>b</sup>

**Nota:** Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

É preciso ter em mente que, no controle de ectoparasitas, a estratégia de utilização de entomopatógenos difere daquela estabelecida para inseticidas químicos. O controle químico promove a redução rápida e temporária dos prejuízos econômicos causados por infestações por artrópodos. Os produtos microbianos reduzem as populações das pragas mais lentamente, sendo os resultados mais duradouros que os proporcionados pelos agrotóxicos. Portanto, os produtos obtidos da *Dalbergia brasiliensis* seriam mais indicados para um combate efetivo às larvas do *Aedes aegypti*, no início da infestação por este inseto. Entretanto, para um efeito mais prolongado torna-se necessário a utilização de produtos microbianos.

## 6. CONCLUSÃO

A espécie *Dalbergia brasiliensis* pertence à família Fabaceae. Vários compostos já foram identificados do gênero *Dalbergia*, entre eles destacam-se os isoflavonóides e neoflavonóides. No presente trabalho foram isolados e identificados dois compostos da casca da espécie. Na fração hexano foi identificado uma mistura de cinco esteroides: colesterol, stigmasterol,  $\beta$  sitosterol, campesterol e stigmata 22 25 dien ol. Na fração clorofórmio foi caracterizado a mistura de dois isoflavonoides, o afrormosin e o fujikinetin. Outros compostos isolados encontram-se em processo de purificação e identificação.

O teste de toxidade não revelou atividade contra o microcrustáceo *Artemia salina*, pois todas as amostras apresentaram um valor de DL50 superior a 1000 $\mu$ g/mL, o que evidencia a baixa toxicidade das amostras. Na avaliação da atividade hemolítica, o mesmo resultado negativo para toxicidade foi evidenciado nas placas de Agar sangue. Na avaliação em tubos, a fração hexanica da folha apresentou resultado positivo necessitando de mais estudos para compreender sua atividade tóxica. A baixa toxicidade dos extratos e frações nos testes realizados demonstra o potencial desta planta para futuros estudos de purificação de outros compostos e de determinação de outras atividades biológicas.

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES *et al.*, 2010). A atividade antioxidante neste estudo foi avaliada por três métodos. Na avaliação da atividade pela redução do complexo do fosfomolibdênio todos os extrato apresentaram atividade, principalmente as frações clorofórmio e acetado de etila da casca e as frações hexano e clorofórmio da folha, pois apresentaram atividade maior que o padrão rutina, atividade considerada 100% no ensaio. Este resultado explica a ocorrência elevada de flavonóides em muitas espécies deste gênero, como também a identificação dos isoflavonoides nesta espécie. No ensaio de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico TBARS a fração hexano e clorofórmio da folha e a fração acetato de etila da casca se destacaram com um índice de atividade antioxidante comparável ao BHT, padrão utilizado pelo

teste. Na redução do radical DPPH os resultados não foram favoráveis a atividade antioxidante.

Avaliando os resultados do ensaio com o *Aedes aegypti*, pode-se inferir que os extratos e frações de *D. brasiliensis* podem atuar como pesticidas no controle de vetores da dengue, destacando-se a fração clorofórmio da casca que obteve DL50 e DL90 inferior às demais.

Considerando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos. Destacam-se, os resultados promissores obtidos nas avaliações biológicas analisadas, aliados às substâncias isoladas identificadas e às que se encontram em processo de purificação. A baixa toxicidade obtida justifica a continuidade da pesquisa na determinação de outras atividades biológicas com estas amostras, evidenciando as múltiplas possibilidades de aplicação desta espécie.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, P. V. **Estudo Fitoquímico de Citrus: Resistência a *Xylella fastidiosa* e Interação com *Oncometopia facialis***. 2006. Dissertação de Mestrado em Ciências. Setor Concentração Química Orgânica. Universidade Federal de São Carlos.
- ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 15, p. 265-267, 1925.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- AKIHISA, T.; TAMURA, T.; MATSUMOTO, T. (222,24S)-Stigmasta-5,22,25-trien-3p-ol and Other Novel Sterols from *Cferodendrum scandens*: First Report of the Isolation of a cis-22-Unsaturated Sterol from a Higher Plant. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, p.2213-2217, 1990.
- ALMEIDA, F.S. A **Alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60p. Circular, 53.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- AMAKO, K.; CHEN, G. X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiol**, v.35, n.3, p.497-504, 1994.
- AMAROWICZ, R. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.** Food Chemistry, v.84, n.4, p. 562-566, 2004.
- ANSARI, M.A.; RAZDAN, R.K.; TANDON, M.; VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent action of Dalbergia sissoo (F. Leguminosae) oil against mosquitoes **Bioresource Technology**, v.73, p.207-211, 2000.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIO (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília. 2003
- ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 2008. p. 113 – 114.
- ASIF, M.; KUMAR, A. Anti-inflammatory activity of extract of Dalbergia sissoo (Roxb.) bark. **Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.1, p.39-50, 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 10.ed. Washington: Editorial Board, 1965.
- ARNON, D. I. Copper and enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n. 2, p.1-15, 1949.
- BARNES, J. P. *et al.* PUTNAM, A.R.; ZBURKE, B.A.; AASSEN, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v.26, n.5, p.1385-1390, 1987.
- BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B.; SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha, Nov. 2003.

BEHLING, E. B., *et al.* Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição**. v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BERNARDINO, D.C.S.; PAIVA, H.N.; NEVES, J.C.L.; GOMES, J.M.; MARQUES, V.B. Influência da Saturação por bases e da relação Ca:Mg do substrato sobre o crescimento inicial de Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*, Vell. **Revista Árvore**, v.31, n.4, 2007.

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BRADFORD, M. M. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, n. , p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 116, de 8.8.1996. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 12 ago 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, 2º Ed. Brasília, 2009.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brasilian medicinal plant research. J. of Ethnopharmacol., 49(2), p. 53-67, 1993.

BURGER, L.M. **Estudo anatômico do xilema secundário de sete espécies nativas do gênero *Dalbergia*, Leguminosae- Faboideae**. 1979. 191p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, P.E.R.; VIANA NETO, J.A.A; DALMAS, I. **Comparação entre essências florestais nativas e exóticas em Quedas do Iguaçu, PR: Resultados Preliminares**. Curitiba: EMPRAPA-CNPf, 1987. (EMBRAPA-CNPf.Circular Técnica,15).

CARVALHO, P.E.R. Louro-pardo. Boletim de Pesquisa Florestal, Curitiba, n.17, p.63-66, 1988.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, P.E.R. **Jacarandá - *Dalbergia brasiliensis***. Curitiba: EMPRAPA-CNPf, 2004. (EMBRAPA-CNPf.Circular Técnica,98).

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5- Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química nova**, V. 23, p. 20-22, 2000.

CHAITHONG, U., W. CHOOCHOTE, K. KAMSUK, A. JITPAKDI, P. TIPPAWANGKOSOL, D. Chaiyasit, D. Champakaew, B. Tuetun, & B. Pitasawat. 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology** 31: 138-144.



CLAUDINO, G.P.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ, R.F.; MATHIAS, L. Estudo fitoquímico do caule de *Dalbergia glaucescens*. Disponível em [www.sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0260-1pdf](http://www.sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0260-1pdf) > Acesso em 10 outubro 2011.

CIRIO, G. M. *et al.* Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v.4, n. 2, p.67-76, 2003.

COELHO, A.M.; PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S. Atividade Larvídica de Extratos Vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em Condições de Laboratório. **BioAssay**, 2009.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.599-601.

DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F.J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T.B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neurosciences Method**, v. 141, n. 2, p. 219-222, 2005.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, 1997. p.396-407.

DECKER, E. A.; WARNER, K.; MARK, P. R.; SHAHID, F. Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 4303, 2005.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p.351-359, 1999.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. -Hil.)**. 2008. 108f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná.

FARAG, F.S.; AHMED, A.S.; TERASHIMA K.; TAKAYA Y.; NIWA, M. Isoflavonoid glycosides from *Dalbergia sisso*. **Phytochemistry**, v.57, p.1263-1268, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. Parte I.

FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FRANÇA, S. C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.499-525, 2001.

FRANKEL, E.D.; FINLEY, J.W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 4901, 2008.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; HAMERSKI, L. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresource Technology**, v.100, p.6647-6650, 2009.

GRAY, T. M. *et al.* Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. **Protein Science**, v.5, n. 4, p.742-751, 1996.

GUPTA, A. S. *et al.* Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol**, v.103, n. 4, p.1067-1073, 1993.

HAJARE, S. W.; CHANDRA,S.; SHARMA,J; TANDAN,S.K.; LAL,J.; TELANG,A.G. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia**. v.72, p.131-139, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999. 936p.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The Characterization of Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p. 601, 1995.

HALLIWELL, B. Antioxidant Characterization, Methodology and Mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, p.1341-1348, 1995.

HEEMANN, A.C.W. **Estudo Fitoquímico, Botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

INDEX KEWENSIS: on compact disc. Oxford University Press, 1997. 1 CD-ROM.

IVANCHECHEN,S.L. **Estudo morfológico e terminológico do tronco e casca de 30 espécies arbóreas em floresta ombrófila mista**. 1988. 221f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 371-372 e 628-638.

KALEGARI, M. **Composição Fitoquímica e Atividades Biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. 120f. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

KASAL, A; BUDESINSKY,M; GRIFFITHS, W,J. **Spectroscopic Methods of Steroid Analysis**, 2010. c.2

KHAN, I.A.; AVERY M.A.; BURANDT,C.L.;GOINS,D.K.;MIKELL,J.R.; NASH T.E.; AZADEGAN,A.; WALKER, L.A. Anti-giardial Activity of Isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark **Journal Natural Products** , v.63, p.1414-1416, 2000.

KELLER, J. N.; LAUDERBACK, C. M.; BUTTERFIELD, D. A.; KINDY, M. S.; MARKESBERY, W. R. Amyloid-beta peptide effects on synaptosomes from Apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 1579–1586, 2000.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LIMA, H.C. *Dalbergia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>> Acesso em: 4 mai 2011.

LIO; R.X.;LI L.;WANG,Q.;WANG,W.;BI,K.S.;GUO,D. Simultaneous Determination of nine flavonoids in *Dalbergia odorifera* **Chromatographia**, v.61, n7/8,2005

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil : arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1995. p. 269.

LUNA,J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MEDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANTANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 199-206, 2005.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Ângelo C.; VEIGA JR, Valdir Veiga; GRYNBERG, Noema F; ECHVARRIA, Áurea. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MALHEIROS, A .; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J, Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochem**, v.30, n.5, p.1431-1433, 1991.

MARTINEZ, A. Steroles. Disponível em: <<http://farmacia.udea.edu.co/~ff>> Acesso em : 06 novembro 2012.

MATOS, J. M. D; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico – prático**. Fortaleza: Edições UFC, 1989. p. 223-229.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bendh-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. R. (Ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam. **Elsevier Science Publis hers B.V.**, v.9 , n.1, p. 383-409, 1991.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v.45, n. 5, p.31, 1982.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity bythe use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130,2001.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species.**Química Nova**,v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006. Brazilian *Croton* species. *Quím. Nova* ,v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. V. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NASCIMENTO, J. E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v.29, n.2, p.145-150, 2008.

NORDBERG, J. e ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001

NUNES JUNIOR, V. **Poliacetilenos do gênero *Pterocaulon***. 1988. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas.

OKWUTE;M.E.; ONYIA,R.; ANENE,C; AMODU,O.P. Protectant, insecticidal and antimicrobial potentials of *Dalbergia saxatilis* Hook f. (fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.23, p.6556-6560, 2009.

OLIVEIRA, V. R. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, v.18, n. 1, p. 537-544, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Quality control methods for medicinal plants methods. 1998. p. 41 – 43.

PAIVA, S. R. de; LIMA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.76, n.3, p.499-504, 2004.

Pan American Health Organization (PAHO) website, 2008. Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas.  
<<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/Dengue.htm>>.

PIETTA, P. Journal of Natural Product,63, p.1035-1042, 2000.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamina E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p. 45-61, 2002.

PINTO, A.C; SIMONI, M.L.P.S; SOCORRO, C; COELHO, R; Misturas Naturais de esteroides, uma alternativa para aplicação de padrões em análises por cromatografia gasosa de alta resolução. **Nota Técnica**, 1993.

POPJBK, G; EDMOND, J; ANET, F; EASTON, N.R. Carbon 13 NMR Studies on Cholesterol Biosynthesized from [3c] Mevalonates. Journal of the American Chemical Society, 99:3, 1977.

PUTTER, J., Peroxidase. In: BERGMAYER, H. U. (ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Verlag Chemie: Weinhan, 1974. p.685-690.

RIAZ, A. Dengue fever: Prevention most recommended, **The Health**, v.2, p.33-34, 2011.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, p.159, 1997.

SALINAS, M.H.R. **Famílias de dicotiledôneas venezuelanas II. Subclases Rosidae y Asteridae: evolution, filogenia, gêneros**. Mérida: [s.n.], 1992.

Sánchez-Moreno, C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2008.

SASAKI, C. M. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Alelopáticas e Antimicrobianas das Partes Aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme (Asteraceae)**. 2008.115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

SINGH, R.H.; CHATURVEDI, G.N. Further studies on the antiarthritic effect of an indigenous drug *Dalbergia lanceolaria*. **Indian Journal of Medical Research**, v.54, 1966.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A.; Métodos de Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, v.22, n. 1, p.94, 1999.

SILVA, M. B. S. Flavonóides com Capacidade Antioxidante. **Química Aplicada**. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <dq.fct.unl.pt>. Acesso em: 20 jul. 2009.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.O.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da UFRS, p.176, 1986.

SONAGLIO, D. et al. Farmacognosia – da planta ao medicamento. Capítulo 13: Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. 6. ed. Editora da UFRGS; Editora da UFSC. 2007. p. 290 – 291.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v.42, n.1, p.1423-1426, 1967.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, F.; BARRETO M.L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad Saúde Pública Rio de Janeiro**, v.25, 2009.

VASUDEVA, N.; VATS, M.; SHARMA, SK ; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Review**, v.3, n.6, p.307-319, 2009.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. of Ethnopharmacol.**, 51, p.239-254, 1996.

World Health Organization. Fiebre amarilla – 2008. Disponível em: WWW.Who.int/topics/yellow\_fever/es/. Acessado em: 04/10/2012

YOUNGSON, R. **Como combater os Radicais Livres**. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, 1996. p. X-XIII.

ZIPSER, B.; BRADFORD, J.; HOLLINGSWORTH, R. Cholesterol and its derivatives, are the principal steroids from the leech species *Hirudo medicinalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Elsevier**, 120, p.269-282, 1998

ZUANAZZI, J.A.S.O. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.p.489-493.

